

Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

**Der Einfluss einer genetischen Variation im GRIN1-Gen
auf kognitive Phänotypen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sonja Forster

aus
Starnberg

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Dan Rujescu

Mitberichterstellerin: Prof. Dr. Elke Holinski-Feder

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Es genügt nicht, gute geistige Anlagen zu besitzen.
Die Hauptsache ist, sie gut anzuwenden.

René Descartes

Meinen Eltern gewidmet

1. Zusammenfassung.....	9
2. Einleitung.....	11
2.1. Intelligenz und Kognition.....	11
2.1.1. Der Intelligenzbegriff	11
2.1.2. Strukturmodelle.....	12
2.1.2.1. Spearmans Zwei-Faktoren-Theorie	12
2.1.2.2. Thurstones multiple Faktorenanalyse	13
2.1.2.3. Cattells hierarchisches Intelligenzmodell	14
2.1.2.4. Wechslers hierarchisches Strukturmodell in drei Ebenen	15
2.1.3. Intelligenzmessung	16
2.2. Genetik und Heritabilität von Intelligenz.....	19
2.2.1. Zwillingsforschung	19
2.2.2. Adoptionsstudien	21
2.2.3. Molekulargenetik.....	22
2.2.3.1. Kopplungsanalysen	23
2.2.3.2. Kandidatengene und Assoziation	23
2.3. Der NMDA-Rezeptor	26
2.3.1. Funktion	27
2.3.2. Der NMDA-Rezeptor und Kognition	30
2.3.3. Expression	32
2.3.4. Struktur	33
2.3.5. Das NMDA-Rezeptor-Gen / GRIN1-Gen	36
3. Fragestellung.....	40
4. Material und Methoden.....	41
4.1. Material	41
4.1.1. Geräte.....	41
4.1.2. Software.....	42
4.1.3. Chemikalien	42

4.1.4. Oligonukleotide	43
4.1.5. Polymorphismus	43
4.2. Probandenrekrutierung	44
4.3. Angewandte Tests zum Ausschluss psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen	45
4.3.1. Körperliche Untersuchung	45
4.3.2. Mini Mental State Test - MMST	45
4.3.3. Strukturiertes Klinisches Interview - SKID	46
4.3.4. Family History Assessment Modules - FHAM	47
4.4. Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene – HAWIE-R ...	48
4.4.1. Allgemeine Beschreibung	48
4.4.2. Untertests	49
4.4.2.1. Verbalteil	49
4.4.2.2. Handlungsteil	51
4.4.3. Durchführung	54
4.4.4. Auswertung	54
4.4.5. Anwendungsbereiche	55
4.4.6. Gütekriterien	55
4.4.7. Normen	56
4.5. DNA-Extraktion	56
4.5.1. Zellyse	57
4.5.2. Adsorption der DNA an die Silikagel-Membran	57
4.5.3. Reinigung der DNA durch Waschen von Verunreinigungen von der Säule ..	58
4.5.4. Elution der DNA von der Silikamembran	58
4.5.5. Bestimmung der DNA-Konzentration: Photometrische Konzentrationsbestimmung	59
4.6. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	60
4.7. Optimierung der Polymerasekettenreaktion	62
4.7.1. Primerdesign	62

4.7.2. Puffer-Optimierung.....	63
4.7.3. Annealing-Temperatur	63
4.7.4. PCR-Ansatz und -Programm	64
4.8. Restriktionsansatz	65
4.9. Gelelektrophorese	66
4.10. Statistische Auswertung	67
5. Ergebnisse	68
5.1. SNP V285V (rs1126442)	68
5.2. Analyse der Allelfrequenz des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) im Vergleich zu den HAWIE-R-Untertests	69
5.3. Analyse der Daten der Genotypen des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) im Vergleich zu den HAWIE-R-Untertests.....	72
5.3.1. Analyse der A-Allel-Träger	74
5.3.2. Analyse der der G-Allel-Träger	76
6. Diskussion	78
6.1. Interpretation der Ergebnisse	78
6.2. Diskussion von methodischen Fehlerquellen	83
6.3. Ausblick auf zukünftige Untersuchungen	88
7. Abkürzungen und Fachbegriffe	90
8. Literaturverzeichnis	92
9. Danksagung	111

1. Zusammenfassung

Kognition und Intelligenz werden sowohl von Umweltbedingungen als auch von genetischen Anlagen beeinflusst. Das glutamaterge System spielt in der Entwicklung des ZNS (Zentralnervensystem) sowie bei vielen wesentlichen Hirnfunktionen wie auch kognitiven Fähigkeiten eine wichtige Rolle. Der gegenwärtig am besten untersuchte Subtyp der Glutamaterezeptoren ist der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) - Rezeptor. Das GRIN1 (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1) -Gen codiert für die essentielle NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, welche ubiquitär in allen Hirnarealen exprimiert wird. Das GRIN1-Gen, lokalisiert auf Chromosom 9q34.3, kann aufgrund zahlreicher Studien als gutes Kandidatengen für verschiedene psychiatrische Erkrankungen angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, inwiefern der Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) in Exon 7 des GRIN1-Gens mit kognitiven Fähigkeiten assoziiert ist.

Zur Ermittlung von Intelligenz und kognitiven Fähigkeiten wurden bei neuropsychiatrisch gesunden Probanden aus München und Umgebung der HAWIE-R (Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene, Revision 1991) durchgeführt und die Ergebnisse mit den Allel- und Genotypverteilungen des SNP (single nucleotide polymorphisms) V285V (rs1126442) verglichen.

Weder bei der Untersuchung der Allelverteilung noch bei den Bestimmungen der Genotypverteilungen konnten signifikante Assoziationen zu Gesamt-, Verbal- oder Handlungs-IQ oder den verschiedenen Untertests des HAWIE-R nachgewiesen werden. Allerdings konnte im Untertest „Wortschatz-Test“ ein Trend ($F=3,111$; $df=1/288$; $p=0,079$) gezeigt werden, wobei Träger des A-Allels (AG, AA) bessere Werte als homozygote G-Träger (GG) erzielten. Auch im Untertest „Figurenlegen“ konnte ein Trend ($F=3,022$; $df=1/288$; $p=0,083$) festgestellt werden; hier erreichten (AA)-Homozygote bessere Werte als Träger des G-Allels (AG, GG).

In der vorgelegten Arbeit kann der Einfluss des Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) des NMDA-Rezeptor-Gens für Untereinheit NR1 auf kognitive Phänotypen, gemessen an HAWIE-R, demnach nicht signifikant erwiesen werden.

Das könnte einerseits darauf beruhen, dass der untersuchte Polymorphismus oder die gesamte NR1-Untereinheit keine oder eine sehr untergeordnete Rolle in Bezug auf Kognition spielt. Es könnte auch sein, dass die NR1-Untereinheit nur in Wechselwirkung mit den anderen Untereinheiten Kognition und Intelligenz beeinflusst, sie also nicht gesondert betrachtet werden kann.

Um einen eindeutigen Aufschluss über die Beteiligung des GRIN1-Gens an Intelligenz und kognitiven Fähigkeiten zu erlangen sind weitere Studien notwendig. Dabei sollte eine möglichst große Anzahl an Polymorphismen über das gesamte Gen hinweg untersucht werden.

2. Einleitung

2.1. Intelligenz und Kognition

2.1.1. Der Intelligenzbegriff

Bis heute liegt keine allgemein anerkannte Definition von Intelligenz vor. Als Begriff der Psychometrie wurde ‚Intelligenz‘ (lat.: intelligentia = Einsicht, Erkenntnisvermögen; intellegere = verstehen) zu Beginn des 19. Jahrhunderts geprägt.

Binet und Simon erklärten 1905 den Begriff Intelligenz als die Art der Bewältigung einer aktuellen Situation, gut zu urteilen, gut zu verstehen und gut zu denken (Amelang und Bartussek 1994).

Andere Definitionen lauten: Intelligenz ist die Fähigkeit zur Erfassung und Herstellung von Bedeutungen, Beziehungen und Sinnzusammenhängen (Wenzl 1957) oder Intelligenz ist die Fähigkeit des Individuums, anschaulich oder abstrakt in sprachlichen, numerischen oder raumzeitlichen Beziehungen zu denken; sie ermöglicht die erfolgreiche Bewältigung vieler komplexer und mit Hilfe jeweils besonderer Fähigkeitsgruppen auch ganz spezifischer Situationen und Aufgaben (Groffmann 1964).

Stern beschreibt Intelligenz 1912 als die allgemeine Fähigkeit eines Individuums, sein Denken bewusst auf neue Forderungen einzustellen; sie ist die allgemeine geistige Anpassungsfähigkeit an neue Aufgaben und Bedingungen des Lebens (Stern 1912) und später 1950 als die personale Fähigkeit, sich unter zweckmäßiger Verfügung über Denkmittel auf neue Forderungen einzustellen (Stern 1950).

Wechsler definiert 1964 Intelligenz als die zusammengesetzte oder globale Fähigkeit des Individuums, zweckvoll zu handeln, vernünftig zu denken und sich mit seiner Umgebung wirkungsvoll auseinanderzusetzen (Wechsler 1964).

Eine Übereinstimmung in der Intelligenzdefinition gibt es lediglich über bestimmte Aspekte der Intelligenz. So scheinen Fähigkeiten des abstrakten Denkens und Schlussfolgerns, des Problemlösens und Wissenserwerbs sowie spezifische

Verhaltensbereiche einen hohen Einfluss auf die Intelligenz darzustellen (Gage und Berliner 1996).

Diese konstitutiven Fähigkeiten fasste Estes 1982 folgendermaßen zusammen: Intelligenz ist das adaptive Verhalten des Einzelnen, gewöhnlich charakterisiert durch ein bestimmtes Problemlösungselement und gesteuert von kognitiven Prozessen und Operationen (Estes 1982).

Mit dem Begriff Kognition (lat.: cognitio = Erkennen) werden Prozesse und Produkte bezeichnet, die auf der Grundlage der Leistungsfähigkeit des Gehirns auf überwiegend intellektuelle, verstandesmäßige Wahrnehmungen und Erkenntnisse bezogen sind. Zu den kognitiven Fähigkeiten des Menschen zählen zum Beispiel Aufmerksamkeit, Wahrnehmungsfähigkeit, Erkenntnisfähigkeit, Schlussfolgerung, Urteilsfähigkeit, Erinnerung, Merkfähigkeit, Lernfähigkeit, Abstraktionsvermögen und Rationalität (Pschyrembel 2002).

2.1.2. Strukturmodelle

Über den Aufbau der Intelligenz gibt es verschiedene Intelligenztheorien. Dabei sind vor allem die Strukturmodelle von Spearman, Thurstone, Cattell und Wechsler zu nennen.

2.1.2.1. Spearmans Zwei-Faktoren-Theorie

Charles Spearman (1863-1945) stellte fest, dass die Personen, die in einem Leistungstest gut waren, tendenziell auch in anderen Tests gut abschnitten. Deshalb nahm er eine einheitliche Wirksamkeit der Intelligenz an, die allen intellektuellen Leistungen zugrunde liegt. Diese allgemeine geistige Fähigkeit drückte er in einem ‚Generalfaktor g' ‘ aus, der das Maß der allgemeinen und angeborenen geistigen Energie sein sollte, während der ‚spezifische Intelligenzfaktor s' ‘ jeweils spezifische,

voneinander unabhängige Fähigkeiten beschreibt. ‚s‘ ist dabei ‚g‘ hierarchisch untergeordnet und bestimmt die Leistung einer Person in einem bestimmten Bereich, z.B. verbale Fertigkeiten. Es existiert also nur ein g-Faktor und mehrere s-Faktoren (Abb. 1). Dieses Modell formulierte Spearman bereits 1904 als Zwei-Faktoren-Theorie der Intelligenz (Spearman 1904; Williams et al. 2003).

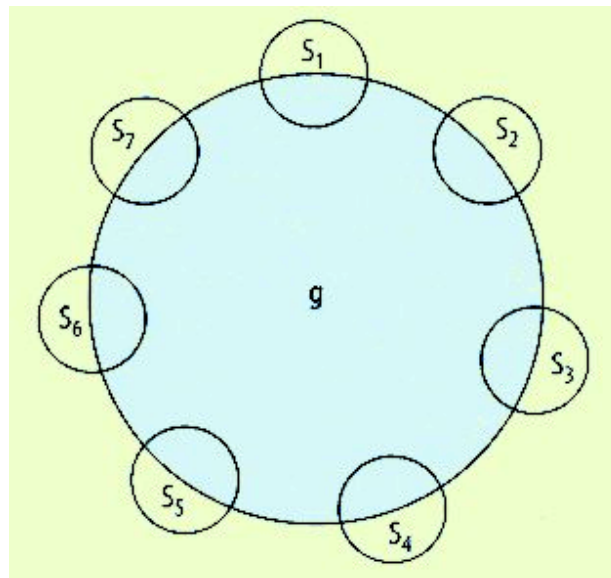


Abb. 1: Zwei-Faktoren-Theorie von Spearman: Der ‚Generalfaktor g ‘ ist das Maß der allgemeinen und angeborenen geistigen Energie, während der ‚spezifische Intelligenzfaktor s ‘ jeweils spezifische, voneinander unabhängige Fähigkeiten beschreibt (Holling 2004).

Die Entdeckung des g -Faktors ist bis heute der zentrale Punkt in Spearmans Modell. Durch die damals neu entwickelte Korrelationsrechnung und die Methode der Faktorenanalyse war die Erkenntnis einer gemeinsamen Quelle für intelligente Leistungen möglich geworden (Holling et al. 2004).

2.1.2.2. Thurstones multiple Faktorenanalyse

Louis Leon Thurstone (1887-1955) hingegen verneinte das Vorhandensein eines Generalfaktors und Spearmans Zwei-Faktoren-Theorie mit der Annahme, dass die Fähigkeit zur Lösung einer bestimmten Intelligenzaufgabe auf mehreren nebeneinander stehenden Intelligenzfaktoren liegt. Er isolierte mit seinen Tests und seiner

multiplen Faktorenanalyse sieben relativ unabhängige Faktoren geistiger Fähigkeiten (primary mental abilities), die jeweils in unterschiedlichem Ausmaß an Intelligenzleistungen beteiligt sein sollen. Zu diesen Primärfaktoren gehören: Sprachverständnis, Wortflüssigkeit, Raumvorstellung, Gedächtnis, numerisches Denken, schlussfolgerndes Denken und Auffassungsgeschwindigkeit (Thurstone 1931; Thurstone 1938; Thurstone 1945).

Aufgrund der Unvereinbarkeit der beiden Theorien von Spearman und Thurstone entstanden verschiedene hierarchische Faktorenmodelle. Diese Intelligenzmodelle nehmen eine hierarchische Ordnung von Intelligenzkomponenten an. Während auf der höchsten Hierarchieebene der Generalfaktor g steht, sind auf einer untergeordneten Ebene spezifische Intelligenzfaktoren angesiedelt.

2.1.2.3. Cattells hierarchisches Intelligenzmodell

Raymond Bernard Cattell (1905-1998) versuchte das Spearman'sche Modell in einem hierarchischen Modell der Intelligenz zu bewahren, indem er zwei Faktoren zweiter Ordnung ermittelte. Er prägte die Begriffe ‚kristalline Intelligenz‘ und ‚fluide Intelligenz‘.

Die fluide Intelligenz ist genetisch bedingt und somit von Kultur und Training unabhängig. Sie stellt die Fähigkeit zu Situationsorientierung, Schlussfolgern, Problemlösung und Verarbeitungsgeschwindigkeit dar. Die kristalline Intelligenz hingegen ist erworben und besteht aus Wissen, Wortschatz und gesammelten Erfahrungen zu Problemlösewegen. Während laut Cattell die fluide Intelligenz im Lauf des Lebens relativ konstant bleibt, können Teile der kristallinen Intelligenz verloren gehen, wenn diese nicht trainiert wird (Cattell 1950; Cattell 1966; Cattell 1971; Cattell 1982).

2.1.2.4. Wechslers hierarchisches Strukturmodell in drei Ebenen

Das Intelligenzmodell von David Wechsler (1896-1981) kann als erweitertes Zweifaktorenmodell oder auch als hierarchisches Modell in drei Ebenen angesehen werden. An die höchste Hierarchieebene setzt er die allgemeine Intelligenz g , die er auf der zweiten Ebene in eine Verbal- und Handlungsintelligenz unterteilt. Diese setzen sich wiederum aus mehreren speziellen Fähigkeiten zusammen (Abb. 2). Zur Erfassung dieser speziellen Fähigkeiten werden Untertests verwendet, die jeweils eine Teilkomponente der verbalen oder der praktischen Intelligenz messen sollen.

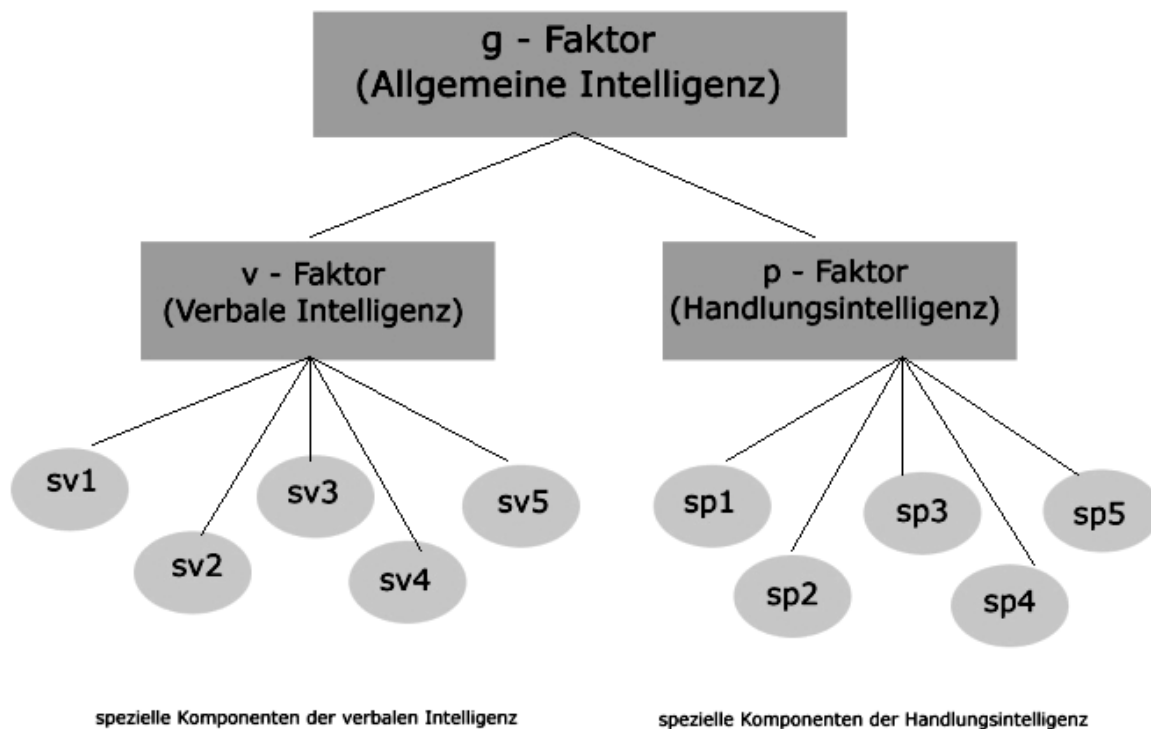


Abb. 2: Wechslers Strukturmodell in drei Ebenen: An der höchsten Hierarchieebene steht die allgemeine Intelligenz g , die auf der zweiten Ebene in eine Verbal- und Handlungsintelligenz unterteilt wird. Diese setzen sich wiederum aus mehreren speziellen Fähigkeiten zusammen (nach Wechsler).

Seine Tests bauen auf der Annahme auf, dass sich Intelligenz aus verschiedenen Fähigkeiten zusammensetzt, wie zum Beispiel einem verbal-symbolischen und einem praktischen Gruppenfaktor nach Thurstone. Gleichzeitig hält Wechsler aber an

einer Zusammenfassung in einer Gesamtintelligenz nach Spearman zur Beschreibung einer Person fest (Tewes 1991; Conrad 1983).

2.1.3. Intelligenzmessung

Versuche, Intelligenz zu messen, lassen sich weit in die Geschichte, bis zu den alten Chinesen und alten Griechen, zurückverfolgen (Zusne 1957).

Alfred Binet, der von der französischen Regierung beauftragt wurde, Einstufungstests für Schüler auszuarbeiten, gelang es 1904, den ersten erfolgreichen Intelligenztest, den Binet-Test, zu entwickeln. Dabei setzte er die Zahl der gelösten Testaufgaben zum Alter des jeweiligen Kindes in Relation.

Zusammen mit Theodore Simon veröffentlichte er 1905 die Binet-Simon-Intelligence-Scale, deren Prinzip bis heute als Standard der Intelligenzmessung verwendet wird: Das Konzept des Intelligenzalters. Unter Intelligenzalter versteht er die in einem Test gemessene individuelle intellektuelle Leistungsfähigkeit im Vergleich zur durchschnittlichen Intelligenz einer Altersgruppe.

Der Begriff Intelligenzquotient (IQ) wurde 1912 von William Stern geprägt. Der Quotient wurde von ihm berechnet, indem er das Intelligenzalter (IA) durch das tatsächliche Lebensalter (LA) dividierte; dieser Wert wurde dann mit 100 multipliziert.

Die in den Anfangszeiten von Binet und Stern verwendete Formel lautet:

$$IQ = \frac{IA}{LA} \times 100$$

Die ursprünglich nur für Kinder, speziell für Schulreifetests, entwickelte IQ-Berechnung wurde später durch Anwendung der populationsbezogenen Skalierung mit dem Mittelwert 100 auf Erwachsene ausgedehnt.

Lewis Madison Terman entwickelte den Binet-Test im Jahr 1916 zum Stanford-Binet-Test weiter und integrierte hier die von Stern entwickelte IQ-Formel. Der Stanford-

Binet-Test ist ein verbaler Intelligenztest, in dem Fragen zum Sinngehalt von Sprichwörtern gestellt und das Satzgedächtnis überprüft wird. Weiterhin werden Orientierung, Zahlengedächtnis, Gegensätze und Wiedergabe der Kernthesen eines gehörten Textes untersucht (Terman 1916; Kelley et al. 1922).

Er wurde in den USA und darüber hinaus zu einem der erfolgreichsten Intelligenztests.

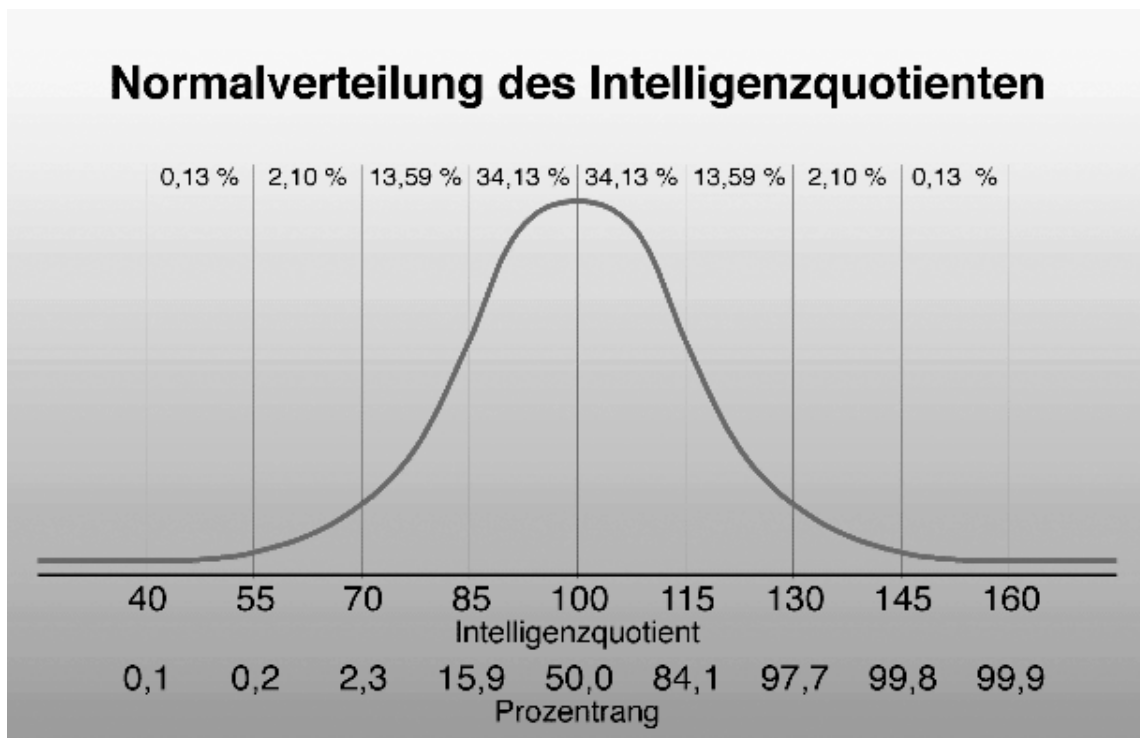


Abb. 3: Normalverteilung des Intelligenzquotienten auf der Gauß'schen Glockenkurve mit einem Mittelwert von 100 und einer Standardabweichung von 15 (Zimbardo und Gerring 1999).

David Wechsler schlug 1932 die Ermittlung des Intelligenzquotienten als sogenannten Abweichungs-IQ vor. Um die Messwerte vergleichen zu können, wurde der IQ auf die Normalverteilung der Gauß'schen Glockenkurve mit einer Standardabweichung von 15 abgebildet (Abb. 3).

Damit liegen rund 68 % der Bevölkerung zwischen den Messwerten 85 und 115 bei einem Durchschnitt von 100 Punkten. Im unteren Bereich wird Lernbehinderung (IQ 85-70), leichte (IQ 69-50), mäßige (IQ 49-35), schwere (IQ 34-20) und schwerste Intelligenzminderung (IQ < 20) unterschieden.

Die heute weltweit gebräuchliche Formel lautet:

$$IQ = 100 + 15 \times \frac{(x - \mu)}{\sigma}$$

x = gemessener Wert (Anzahl der Punkte, die in einem Test erreicht wurden)

μ = Durchschnitt der jeweiligen Altersgruppe

σ = Standardabweichung

1939 entwickelte Wechsler eine Testbatterie, die unter dem Namen Wechsler Bellevue Intelligence Scale (WBIS) bekannt wurde (Wechsler 1939). Im Jahre 1955 entwickelte er den Intelligenztest WAIS (Wechsler Adult Intelligence Scales), der als HAWIE (Hamburg-Wechsler Intelligenztest für Erwachsene) 1956 in Deutschland erschien (Groffmann 1964; Guthke 1980; Tewes 1991). Er besteht aus insgesamt 11 Untertests, die sich aus 6 Verbaltests und 5 Handlungstests zusammensetzen. Dadurch kann der Gesamt-IQ, aber auch differenziert der Verbal- und Handlungs-IQ, bestimmt werden. Heute zählt er zu den weitverbreitetsten Intelligenztests und weist eine hohe Validität und Stabilität in allen Altersgruppen auf (Bouchard und McGue 1981).

IQ-Test-Auswertungen ergaben eine lebenslange Stabilität und Validität der Intelligenz. Die über die ganze Lebensspanne, von Kindheit bis zum hohen Erwachsenenalter, bestehende Stabilität und Validität wurde maßgeblich in einer follow-up Studie in Schottland untersucht. Hier wurden die in Reihenuntersuchungen gesammelten gültigen IQ-Testauswertungen von fast jedem, der 1932 eingeschult wurde, mit den Daten verglichen, die in erneuten IQ-Messungen der 68 Jahre später noch lebenden 500 Probanden erhoben wurden. Hierbei zeigte sich eine Korrelation von 66 % zwischen den IQ-Punktzahlen derselben Tests, die jeweils im Lebensalter von 11 und 79 Jahren erhoben wurden (Deary et al. 2004a).

2.2. Genetik und Heritabilität von Intelligenz

Es ist erwiesen, dass menschliche Intelligenz und Kognition erheblich durch genetische Faktoren beeinflusst werden. Im Allgemeinen lassen die Ergebnisse verschiedener Studien, wie Zwillings- und Adoptionsstudien, auf eine Heritabilität von 60 bis 80% schließen (Plomin und Petrill 1997; Bouchard 1998; Boomsma 1993; Chipuer et al. 1990; Devlin et al. 1997; McClearn et al. 1997).

2.2.1. Zwillingsforschung

In der klassischen Zwillingsforschung werden monozygote Zwillinge und dizygote Zwillinge untersucht. Da eineiige Zwillinge genetisch fast identisch sind, können durch den Vergleich getrennt aufgewachsener eineiiger Zwillinge Rückschlüsse darauf gezogen werden, welche Eigenschaften angeboren und welche erlernt sind (Plomin et al. 1999).

Der älteste Forschungsansatz sind genealogische-statistische Analysen, durch die Francis Galton bereits 1875 zu dem Ergebnis kam, dass für Begabung und Intelligenz genetische Erbanlagen erheblich wichtiger als Umwelteinflüsse sind. Er war der Erste, der empirische Methoden zur Vererbung geistiger Eigenschaften, insbesondere der Hochbegabungen, anwandte. Sein berühmtestes Werk ‚Hereditary Genius‘ (1869) kann als Vorläufer der Verhaltensgenetik angesehen werden (von Rosenstiel 1992).

Eine erste Zwillingsstudie wurde 1937 von Newman, Freeman und Holzinger durchgeführt. Sie benutzten den Stanford-Binet Test und verwendeten eine Stichprobe von 19 Paaren getrennt aufgewachsener eineiiger Zwillinge. Diese Untersuchung zeigte für getrennt aufgewachsene eineiige Zwillingen eine Korrelation von 67% und für gemeinsam aufgewachsenen eineiigen Zwillingen eine Korrelation von 91% und damit eine eindeutige Erblichkeit der gemessenen Intelligenz (Newman et al. 1937; Borkenau 1993).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Burt et al., die über den Vergleich von Verwandtschaftsdaten bei Londoner Schulkindern einen Anteil zwischen 77% und 88% für anlagebedingte Faktoren ermittelten (Burt et al. 1966). Auch Shields et al., die 1962 eine Stichprobe von 41 Paaren getrennt aufgewachsener, eineiiger Zwillinge durch allgemeinere sprachungebundene Intelligenztests untersuchten, konnten eine Korrelation von 77% feststellen (Shields et al. 1962). Zur Untersuchung des Anlage-Umwelt-Anteils für Intelligenz bereiteten 1970 Jinks und Fulker die gesammelten Daten von Zwillingsstudien auf und kamen auf einen Anlageanteil von 80% während Jensen et al. 1972 für Anlage 85%, für Umwelt 10% und 5% als Messfehler ermittelten (Eysenck 1975).

Am bekanntesten wurde die ab 1979 von Bouchard durchgeführte „Minnesota-Studie“, eine Studie mit 127 monozygoten, getrennt voneinander aufgewachsenen Zwillingspaaren, die weltweit ausgewählt wurden. Die Trennung der Zwillinge und zum Teil auch Drillings erfolgte für einen Zeitraum von fünf Monaten bis maximal vier Jahren. Die Ergebnisse zeigten bei getrennt aufgewachsenen monozygoten Zwillingen eine Korrelation von 69% bezüglich des WAIS (Bouchard et al. 1981; Eberhard-Metzger 1998).

In einer Zwillingsanalyse des Western Reserve Twin Projects wurde angenommen, dass verschiedene Fähigkeiten unterschiedlich von Genen und Umwelt beeinflusst werden. Es wurden 17 verschiedene Untertests aus dem Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC) und anderen Testbatterien getrennt untersucht. Die Studie ergab, dass alle Testergebnisse gleichermaßen genetisch beeinflusst werden, also ein genetischer Generalfaktor ‚ g ‘ existiert. Zusätzlich wurden einige genetische Effekte gefunden, die spezifisch für Bereiche wie verbale und räumliche Auffassungsgabe, Wahrnehmungsgeschwindigkeit und Gedächtnisfunktion sind (Luo et al. 1994).

Dasselbe wurde in einer holländischen Zwillingsstudie herausgefunden, in der an 194 Paaren erst im Alter von 16.1 Jahren der Test „Raven’s Progressive Matrices“ und dann im Alter von 17.6 Jahren der HAWIE durchgeführt wurde. Die Heritabilität wurde hier für den Gesamt-IQ auf 82 %, für den Verbal-IQ auf 84 % und für den Handlungs-IQ auf 68 % geschätzt. Für die verschiedenen Untertests ergab sich eine Erbllichkeit von 27 bis 76 %, mit einem Mittelwert von 56 %, bzw. ein Einfluss von Umweltfaktoren von 24 bis 73 %, mit einem Mittelwert von 44 % (Rijsdijk et al. 2002).

Ob dies auch für Erwachsene zutrifft, wurde in einer holländischen Studie untersucht, in der mehrere hundert Erwachsene in zwei Kohorten mit dem Lebensalter von ca. 26 Jahren und ca. 50 Jahren aufgeteilt wurden. An ihnen wurde eine holländische Version des HAWIE durchgeführt. Die Abhängigkeit von genetischen Faktoren wurde hier zu 85 % für den Verbal-IQ und zu 69 % für den Handlungs-IQ bestimmt. Für gemeinsame Umweltbedingungen wurden keine signifikanten Auswirkungen gefunden. Die Heritabilität der vier Wechsler-Kognitionsbereiche wurde folgendermaßen eingeschätzt: Sprachverständnis 84 %, Arbeitsgedächtnis 65 %, Wahrnehmungsvermögen 68 % und Bearbeitungsgeschwindigkeit 63 % (Posthuma et al. 2001; Posthuma et al. 2003).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser verschiedenen Zwillingsstudien, dass Intelligenz zu 60 bis 80% von genetischen Faktoren beeinflusst ist.

Der Nachteil bei Zwillingsstudien besteht darin, dass Zwillinge durch Abweichungen in der Entwicklung (mehr prä- und postnatale Komplikationen, Geburt im Schnitt 3-4 Wochen eher, verzögerte Sprachentwicklung sowie um 30% verringertes Geburtsgewicht) nur bedingt repräsentativ sind und dadurch genetische Effekte eventuell überschätzt werden. Dieser Nachteil kann bei Adoptionsstudien ausgeschlossen werden.

2.2.2. Adoptionsstudien

In Adoptionsstudien wird untersucht, wie hoch die Korrelation zwischen Kindern und ihren Adoptiveltern sowie ihren leiblichen Eltern ausfällt. Häufig werden auch die leiblichen Kinder der Adoptiveltern mit hinzugezogen (Zimbardo und Gerring 1999).

Das „Colorado adoption project“ schloss adoptierte Kinder mit ihren Adoptiveltern, ihren biologischen Müttern und einigen ihrer biologischen Väter ein.

An den Eltern wurde eine 3-stündige Testbatterie durchgeführt, die Kognition, Persönlichkeit und andere Messungen bewertete. Die Kinder wurden im Alter von 1, 2, 3 und 4 Jahren zuhause und im Alter von 7 und 12 Jahren in

Untersuchungszentren getestet. Im Alter von 9, 10 und 11 Jahren unterzogen sie sich einer telefonischen Befragung.

Im Alter von 4 Jahren korrelierte die Heritabilität für spezifische kognitive Fähigkeiten nicht signifikant bei 12% für Sprachverständnis, 31% für räumliches Vorstellungsvermögen, 21% für Wahrnehmungsvermögen und 6% für visuelles Gedächtnis (Rice et al. 1986). Die Heritabilitätskorrelation der generellen Gedächtnisleistung stieg im Alter mit den Werten 9, 14, 10, 20 und 36% für das 1., 2., 3., 4. und 7. Lebensjahr (Fulker et al. 1988). Bezüglich gemeinsamer Umweltfaktoren ergaben sich keine Signifikanzen.

Für das Lebensalter von 12 Jahren ergab sich aus 175 Adoptionsfamilien und 209 Kontrollfamilien, gemessen anhand einer Mischung verschiedener Tests, folgende Zahlen für die genetische Korrelation der verschiedenen Bereiche: 26 % für Sprachverständnis, 35 % für räumliches Vorstellungsvermögen, 38 % für Wahrnehmungsvermögen und 53 % für Gedächtnis. Genetische Korrelationen zwischen den Leistungsbereichen reichten von 27 % bis 58 %. Daraus wurde geschlossen, dass spezifische kognitive Fähigkeiten von einem durchdringenden genetischen Faktor beeinflusst werden (Cordon et al. 1992; Alarcon et al. 1998).

2.2.3. Molekulargenetik

Dass die Genetik einen bedeutenden Einfluss auf Intelligenz und Kognition hat, wurde also bereits in einer großen Anzahl von Studien nachgewiesen. Welche spezifischen Gene dafür verantwortlich sind, wird mittels molekulargenetischer Untersuchungen erforscht.

2.2.3.1. Kopplungsanalysen

Kopplungsanalysen sind Kartierungsverfahren für Gene. Dabei wird bei möglichst vielen genetischen Merkmalen eines Chromosoms untersucht, wie häufig sich diese bei Rekombinationsereignissen getrennt haben.

Bisher wurden zwei genomweite Kopplungsstudien für Intelligenz veröffentlicht (Luciano et al. 2006; Posthuma et al. 2005). Diese zeigen Daten von australischen Zwillingen, an denen Untertests der „Multidimensional Aptitude Battery“, und von holländischen Zwillingen, an denen der HAWIE durchgeführt wurde. Es zeigten sich Heritabilitätswerte von 59 % für den Handlungs-IQ bei den Australiern und bis zu 86 % für den Gesamt-IQ bei den Holländern.

Eine signifikante Kopplung wurde an den Chromosomen 2q und 6p gefunden. Die Kopplung an 2q war für den Handlungs-IQ spezifisch und für den Verbal-IQ unerheblich, weswegen angenommen wurde, dass sie wahrscheinlich nicht die allgemeine Intelligenz ‚g‘, sondern eine spezifische räumliche Verarbeitungsfähigkeit reflektiert. Die Kopplung an 6p war signifikant für den Gesamt-IQ und zeigte andeutungsweise Kopplung für Handlungs- und Verbal-IQ, woraufhin geschlossen wurde, dass dieser Locus eine generelle Leistungsfähigkeit beeinflussen könnte.

In diesen Regionen sind einige Kandidatengene vorhanden, von denen mehrere mit dem glutaminergen Neurotransmittersystem verbunden sind, was zu der Annahme führt, dass sie einen Einfluss auf Funktionen des präfrontalen Kortex haben könnten (Huntsman et al. 1998).

Die Kopplung des Gesamt-IQ liegt nahe der Stelle von Neuritin1, einem Gen, das mit der Entwicklung des Nervensystems und der Langzeitplastizität assoziiert ist, (Naeve et al. 1997) sowie nahe der Stelle der Sukzinatsemialdehyddehydrogenase.

2.2.3.2. Kandidatengene und Assoziation

Es existieren verschiedene Strategien, um mögliche Kandidatengene zu finden, die für Abweichungen der Kognitionsleistung maßgeblich sind (Goldstein et al. 2003).

Eine Möglichkeit ist, Gene zu untersuchen, die für kognitive Defizite verantwortlich sind. Es wurden bereits über 300 Gene identifiziert, die mit mentaler Retardierung in Zusammenhang stehen. Zu den bekanntesten Erbkrankheiten und Chromosomenaberrationen zählen z.B. Phenylketonurie, Down-Syndrom und Fragiles-X-Syndrom (Inlow und Restifo 2004; Ramakers 2002). Hierbei handelt es sich allerdings meistens um komplexe Erkrankungen mit sehr gravierender Intelligenzminderung und zusätzlichen schwerwiegenden Symptomen. Daher sind sie weniger geeignet, um Rückschlüsse auf Abweichungen des IQ im Normalbereich zu schließen.

Eine weitere Möglichkeit Kandidatengene zu finden ist, Gene zu untersuchen, die einen Einfluss auf kognitive Alterung zeigen, also Gene, die mit Demenz, Gedächtnis, kardiovaskulären Erkrankung und oxydativem Stress in Verbindung stehen (Deary et al. 2004b). Eine Analyse von 38 Studien mit über 20000 Probanden ergab, dass das Vorhandensein des E4 Allels des APOE-Gens bei älteren Menschen mit schlechteren Ergebnissen in Tests für allgemeine kognitive Funktionen, episodisches Gedächtnis und Ausführungsfunktion assoziiert ist. Das E2 Allel scheint hingegen protektiv zu sein (Small et al. 2004; Deary et al. 2002). Die Mechanismen, wodurch die Variationen für Kognition abträglich oder protektiv wirken, sind bisher unklar (Smith 2002).

Weitere Studien belegten, dass Variationen im KLOTHO-Gen, das eine lebensverlängernde Wirkung haben soll, (Deary et al. 2005b) und Polymorphismen des Nicastrin-Gens, das mit dem Morbus Alzheimer in Verbindung steht, (Deary et al. 2005a) mit Intelligenz verknüpft sein könnten. Andere Gene, deren Variationen möglicherweise mit Intelligenz in Verbindung stehen, sind der cholinerge Muskarinrezeptor 2 (CHRM2) (Comings et al. 2003) und Cathepsin D (Payton et al. 2003), da sie einen Einfluss auf Demenzentwicklung haben. Weiterhin wurde eine signifikante Assoziation von Variationen des Gens der Sukzinatsemialdehyddehydrogenase, einem Enzym, das am Metabolismus des Neurotransmitter gamma-Aminobuttersäure (GABA) beteiligt ist, mit Kognition festgestellt (Plomin et al. 2004). Zudem nimmt man einen Zusammenhang zwischen Variationen des Gens für die Catechol-O-Methyl Transferase (COMT), eines Enzyms des Dopaminabbaus, und präfrontal-exekutiven kognitiven Fähigkeiten an (Winterer und Goldman 2003; Lachman et al. 1996).

Da bei psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere bei Schizophrenie (Randolph et al. 1993; Mohamed et al. 1999; Cirillo und Seidman 2003; Skelley et al. 2008; Perry et al. 2000; Huguelet et al. 2002), oft kognitive Fähigkeiten beeinträchtigt sind, ist es denkbar, dass die Gene, die mit den entsprechenden Erkrankungen assoziiert sind, auch bei gesunden Menschen die Kognition beeinflussen (Aylward et al. 1984). In verschiedenen Assoziationsstudien konnten signifikante Assoziationen zwischen den Polymorphismen des GRIN1-Gens und Schizophrenie festgestellt werden (siehe Absatz 2.3.5).

Das in dieser Arbeit untersuchte GRIN1-Gen kann aufgrund verschiedener Studien als gutes Kandidatengen für psychiatrische Erkrankungen angesehen werden (Zhao et al. 2006, Qin et al. 2005, Begni et al. 2003).

In Assoziationsstudien wird der Zusammenhang zwischen Allelen ausgewählter Kandidatengene und bestimmten Phänotypen analysiert. Bei klassischen Assoziationsstudien wird eine Patientenstichprobe mit einer Kontrollgruppe gesunder Probanden verglichen. Wenn der spezifische genetische Marker signifikant häufiger bei der Patientengruppe als bei der Kontrollgruppe vorkommt, liegt eine Assoziation vor (Böddeker und Ziegler 2000).

Plomin, Butcher und Kollegen führten verschiedene Studien durch, um auf diese Weise genetische Varianten zu finden, die kognitive Fähigkeiten beeinflussen. In der 2005 veröffentlichten, ersten genomweiten Allel-Assoziationsstudie für Kognition konnten für fünf der 10000 SNPs replizierbare Assoziationen festgestellt werden. Diese liegen auf den Chromosomen 2, 6, 7, 11 und 18. Die Funktionen, die mit diesen SNPs in Zusammenhang stehen, sind bisher unbekannt. Ein SNP liegt in der Region des Hitzeschockproteins HSPA8 auf Chromosom 11 (Butcher et al. 2005).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie untersuchten Butcher et al. die Intelligenz von 7000 Siebenjährigen und verglichen in einer ersten Stufe über 500000 SNPs der Kinder, die bei den Intelligenztests am besten abgeschnitten hatten, mit denen, die am schlechtesten gewesen waren. Hierbei konnten sie insgesamt 47 Varianten erfassen, die stark mit dem IQ der Kinder korrelierten. In einer zweiten Stufe wurden diese 47 Gene bei einer kleineren Stichprobe untersucht, die das gesamte Intelligenzspektrum abdeckte. Die Ergebnisse zeigten 6 SNPs, deren Varianten klar

mit der kognitiven Leistungsfähigkeit der Kinder in Beziehung standen. Allerdings zeigte die statistische Auswertung, dass alle 6 SNPs zusammengekommen nur etwas mehr als 1% der individuellen kognitiven Fähigkeiten erklären (Butcher et al. 2008).

In einer weiteren Studie wurden Assoziationsanalysen von 100 Markern in der Nähe von Kandidatengenen in Gruppen mit niedrigem und hohem IQ durchgeführt. So konnte ein Zusammenhang eines funktionellen Polymorphismus im Gen der Sukzinatsemialdehyddehydrogenase (aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1) mit kognitiver Leistungsfähigkeit gefunden werden (Plomin et al. 2004).

In einer vor Kurzem durchgeführten genomweiten Genotypisierung (GWA) mit mehr als 500000 SNPs wurden 479 Schizophreniepatienten und 2937 Kontrollpersonen untersucht und die Ergebnisse in weiteren Stichproben, bestehend aus 16726 Individuen, repliziert. Dabei konnte für verschiedene SNPs eine Überlappung zwischen Schizophrenie, bipolaren Störungen und schizoaffektiven Störungen festgestellt werden, so dass ein genetischer Overlap zwischen psychotischen Störungen sehr wahrscheinlich ist (O'Donovan et al. 2008, Moskovina et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit wird die Assoziation zwischen dem NMDA-Rezeptor und Kognition untersucht, da es Hinweise darauf gibt, dass der NMDA-Rezeptor eines der wesentlichen Elemente für die Induktion synaptischer Plastizität ist. Damit stellt er einen molekularen Mechanismus für Lernen, Erinnerungsvermögen und Gedächtnisbildung dar und spielt damit eine wichtige Rolle bei humanen kognitiven Funktionen (Sugiura et al. 2001; Constantine-Paton und Cline 1998; Cull-Candy et al. 2001; McNaughton und Barnes 1990; Shapiro und Eichenbaum 1999; Aamont und Constantine-Paton 1999).

2.3. Der NMDA-Rezeptor

Das glutamaterge System spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des ZNS sowie bei vielen wesentlichen Hirnfunktionen. Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des Zentralnervensystems. Es wird synaptisch

freigesetzt und aktiviert spezifische Rezeptoren, wobei zwischen ionotropen und metabotropen Rezeptoren unterschieden wird.

Metabotrope Glutamaterezeptoren unterteilen sich in acht verschiedene Subtypen, die mit mGluR 1 – 8 bezeichnet werden. Sie vermitteln die langsame glutamaterge Signaltransduktion, indem sie über G-Proteine (Guanin-Nukleotid-Bindungsprotein) intrazelluläre Botenstoffe freisetzen. Diese modulieren wiederum andere Stoffwechselkaskaden (Pin und Duvoisin 1995).

Die ionotrope Glutamaterezeptorfamilie bildet kationspezifische Ionenkanäle und kann aufgrund pharmakologischer und elektrophysiologischer Eigenschaften in die Subtypen α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate (AMPA), Kainat (KA) und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) unterteilt werden (Dunah et al. 1999; Seeburg 1993; Dingledine et al. 1999).

Die Erregung von AMPA- und KA- Rezeptoren führt zu einem spannungs-unabhängigen depolarisierenden Einstrom von Natriumionen. Aufgrund ihrer raschen Kinetik dienen sie hauptsächlich der schnellen glutamatergen Informationsübertragung. Da sie wenig calciumpermeabel sind tragen sie nur geringfügig zu Prozessen bei, die durch erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel ausgelöst werden (Nicholls 1993). NMDA-Rezeptoren sind tetramere nichtselektive Kationenkanäle, die zusätzlich zur ligandenabhängigen Aktivierung eine Spannungsabhängigkeit zeigen. Sie besitzen eine hohe Permeabilität für Calciumionen. Der NMDA-Rezeptor ist der gegenwärtig am besten untersuchte Subtyp der Glutamaterezeptoren (Brewer und Cotman 1989).

2.3.1. Funktion

Der NMDA-Rezeptor ist in der postsynaptischen Membran lokalisiert und steuert selektiv den Ionenfluss am nachgeschalteten Neuron (Abb. 4). Er ist spannungs-abhängig und transmittergesteuert. Da sein Ionenkanal durch Magnesiumionen blockiert wird, trägt er beim Ruhepotential (-70 mV bis -50 mV) nur geringfügig zu erregenden postsynaptischen Potentialen bei.

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erfolgt, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Zwei Glycinmoleküle binden an die NR1-Untereinheiten.
- Zwei Glutamatmoleküle binden an die NR2-Untereinheiten (Clements und Westbrook 1991).
- Die Zellmembran, an der sich der Rezeptor befindet, ist depolarisiert, damit die im Ruhezustand tonisch vorherrschende Mg^{2+} Blockade des Ca^{2+} -Kanals aufgehoben wird.

Sind diese Bedingungen erfüllt, kommt es zu einem Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} Ionen in die Zelle und einem Ausstrom von K^{+} Ionen aus der Zelle (Meguro et al. 1992). Der Calciumioneneinstrom löst eine Kaskade von Folgereaktionen, wie z.B. die Aktivierung phosphorylierender Enzyme, aus (Trujillo 1995).

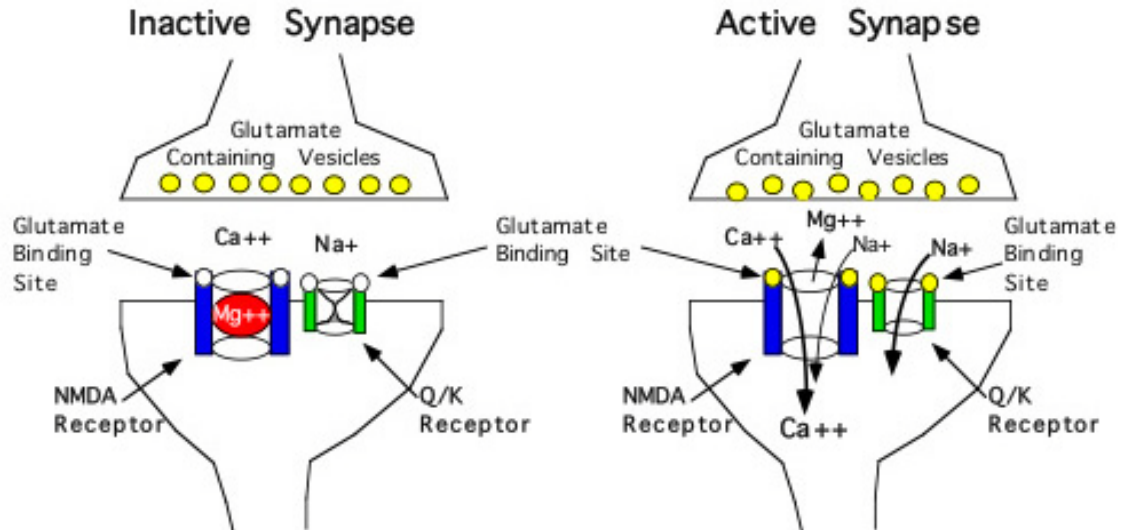


Abb. 4: Steuerung des Ionenflusses: Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erfolgt, wenn zwei Glycinmoleküle an die NR1 Untereinheiten binden, zwei Glutamatmoleküle an die NR2 Untereinheiten binden und die Zellmembran, an der sich der Rezeptor befindet, depolarisiert ist, damit die im Ruhezustand tonisch vorherrschende Mg^{2+} Blockade des Ca^{2+} -Kanals aufgehoben wird (Division of Biological Sciences 2010).

In der synaptischen Übertragung werden die Kanäle langsam geöffnet und geschlossen, und es besteht eine hohe Permeabilität für Calciumionen. Dadurch kann der Rezeptor nachgeschaltete Signalkaskaden induzieren, welche für die Plastizität in der Erregungsübertragung wichtig sind. Eine zu hohe Calciumionenkonzentration kann dabei neurotoxisch wirken und bei Übererregung des Rezeptors zum Zelltod führen (Choi 1992).

Die Bindung von Rezeptormodulatoren, wie Polyamin, Zinkionen oder Protonen, an verschiedene Bindungsstellen des Rezeptors verleihen dem NMDA-Rezeptor unterschiedliche Eigenschaften, die je nach seiner Zusammensetzung variieren (McDonald et al. 1998).

Auf den NMDA-Rezeptor antagonistisierend wirkende Substanzen sind u. a. MK-801, Phencyclidin, Ketamin und Ethanol (Abb. 5) (Zigmond 1999).

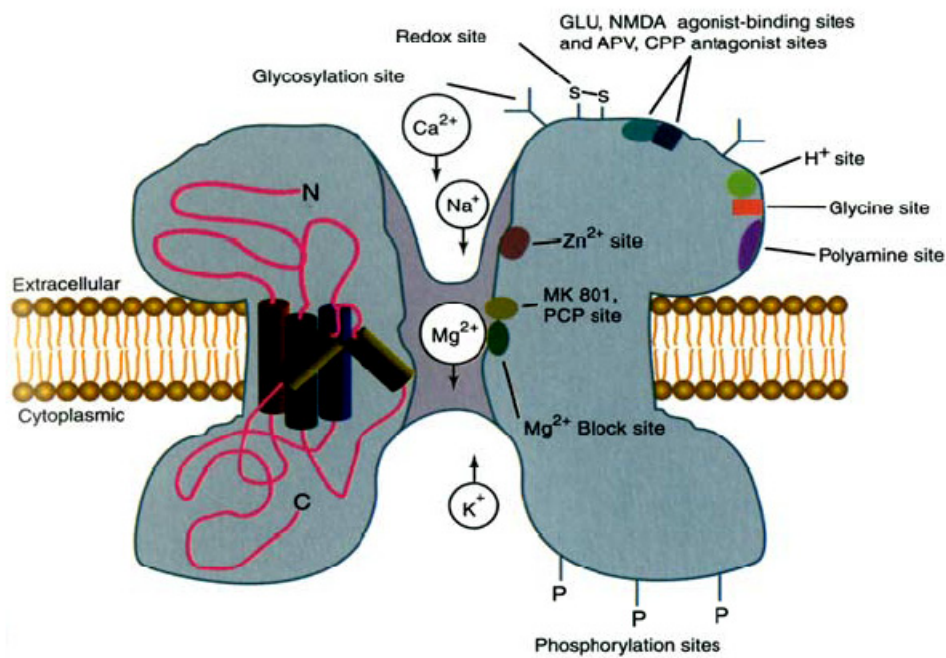


Abb. 5: Schematische Darstellung, die den NMDA-Rezeptor mit Bindungsstellen für Agonisten, Antagonisten und Regulatoren beschreibt. Auf den NMDA-Rezeptor antagonistisierend wirkende Substanzen sind u. a. MK-801, Phencyclidin, Ketamin und Ethanol (Zigmond 1999).

Der NMDA-Rezeptor ist in vielen neuronalen Funktionen, wie schneller Informationsübertragung, Proliferation (Gould und Cameron 1997), Plastizität, neuronaler Migration (Komuro und Rakic 1998) und Langzeitpotenzierungen, von großer Bedeutung. Weiterhin spielt er während der Entwicklung bei der Synaptogenese und Formung neuronaler Netzwerke eine wichtige Rolle. Die exakte Komposition der Untereinheiten determiniert die biophysischen Charakteristika der NMDA-Rezeptoren und ihre regionsspezifische funktionale Diversität. Hirnregionale Unterschiede in der Untereinheitenzusammensetzung der NMDA-Rezeptoren bilden die Grundlage für eine Vielzahl von physiologischen (Hirnreifung, synaptische Plastizität, Gedächtnis, Emotion, Motorik) und pathophysiologischen Prozessen (Schizophrenie, Epilepsie, Apoplex), an denen der NMDA-Rezeptor partizipiert (Bear et al. 1987; Constantine-Paton et al. 1990; Kandel und O'Dell 1992).

Es wird angenommen, dass die Leitfähigkeitserhöhung des NMDA-Rezeptors eines der wesentlichen Elemente für die Induktion synaptischer Plastizität ist und damit einen molekularen Mechanismus für Lernen, Erinnerungsvermögen und Gedächtnisbildung darstellt.

2.3.2. Der NMDA-Rezeptor und Kognition

Studien ergaben, dass die neuronale Plastizität, die sich durch Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) äußert, für verschiedene Formen von Lernen und Gedächtnis verantwortlich ist. Dabei wird die Langzeitpotenzierung im Wesentlichen vom glutamatergen System gesteuert und einige Formen des Lernens durch Blockierung der NMDA-Rezeptoren gehemmt.

Morris et al. zeigten 1986 in einer Studie, in der sie zwei Gruppen von Ratten den Weg durch ein Labyrinth lernen ließen, dass der kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoic (AP-5) das räumliche Lernen beeinträchtigt. Wiederholte intraventrikuläre Injektionen von AP-5 führten zu einem selektiven Verlust des räumlichen Lernens, welches hochsensibel auf hippocampale Schädigung ist. Das visuelle Unterscheidungslernen, welches nicht sensibel ist, blieb unbeeinträchtigt (Morris et al. 1986).

Später wurde entdeckt, dass NMDA-Rezeptoren nicht nur mit räumlichem Denken in Zusammenhang stehen, sondern auch auf nicht-räumliche, deklarative Aspekte des Lernens Einfluss haben (Roberts und Shapiro 2002). Verschiedene Tierversuche ergaben, dass partielle Agonisten die NMDA-Rezeptor-Aktivität steigern und so zum Beispiel D-Cycloserine (DCS) Lernen und Gedächtnis, einschließlich assoziatives Lernen und visuelles Wiedererkennungsgedächtnis verbessern (Watkins 2000).

Matsuoka et al. zeigten, dass Rhesusaffen, die versuchten, auf einem Computer Graphiksymbole wiederzuerkennen, ihre Fähigkeiten bereits nach einer einmaligen intramuskulären Gabe von DCS (100-1000 µg/kg) verbesserten (Matsuoka und Aigner 1996). Monahan et al. konnten bei Ratten eine bessere Durchführung des Aufgabenlernens nach DCS-Gabe nachweisen. Pitkanen et al. stellten bei Ratten eine Funktionsverbesserung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses nach DCS-Gabe und eine Verschlechterung nach Gabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 fest (Monahan et al. 1989; Pitkanen et al. 1995). Stefani et al. zeigten ebenfalls an Ratten, dass MK-801, infundiert in den präfrontalen Kortex, die Verhaltensanpassungsfähigkeit herabsetzt (Stefani et al. 2003).

Rowland et al. gelang es, die bereits an Tieren erfolgreich durchgeführten Studien mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin auf Menschen zu übertragen. In einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie wurde den Probanden Ketamin bzw. ein Placebo per einer 60-minütigen Infusion verabreicht und kognitive Aufgaben in Verbindung mit Verhaltensweisen beurteilt. Ketamin beeinträchtigte das Erlernen von räumlichen und verbalen Informationen. Hierbei standen schizophrenieähnliche Symptome signifikant mit den räumlichen und verbalen Lernfunktionen in Zusammenhang. Nicht signifikant beeinflusst waren Aufmerksamkeit, Wortflüssigkeit und verbales Arbeitsgedächtnis. Das räumliche Arbeitsgedächtnis war leicht eingeschränkt (Rowland et al. 2005).

Selektive Knock-out-Studien an Tieren zeigten, dass NMDA-Untereinheiten wahrscheinlich die höchste a-priori Funktion für verschiedene Phänotypen inklusive Lernen und Gedächtnis haben (Tsien et al. 1996; McHugh et al. 1996). NR1-/- Knock-out-Mäuse sterben neonatal infolge von Entwicklungsaberrationen in lebenswichtigen Hirnstammzentren (Forrest et al. 1994). Wenn der NR1 Knock-out auf die CA1-Region des Hippocampus beschränkt wird, sind Mäuse lebens- und fortpflanzungsfähig. CA1-NR1-/- Mäuse zeigten beeinträchtigtes räumliches Lernen

und eine schwächere Ausprägung der räumliche Spezifität hippocampaler Ortszellen sowie Gedächtnisdefizite in einer Objektwiedererkennungsaufgabe, einer Geruchsdiskriminationsaufgabe und einer Furchtkonditionierungsaufgabe.

Mittels eines induzierbaren CA1-NR1 Knock-outs, bei dem das Gen an- und wieder abgeschaltet werden kann, konnte gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptoren in der CA1-Region des Hippocampus für die Gedächtniskonsolidierung nach einer Lernepisode kritisch sind. CA1-NMDA-Rezeptoren sind offensichtlich nicht nur für das anfängliche Lernen verschiedener Aufgaben wichtig, sondern auch für die Konsolidierungsphase, die unmittelbar nach dem Training beginnt und mindestens eine Woche anhält (Shimizu et al. 2000). Daraus lässt sich folgern, dass die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in der CA1-Region offenbar für die Ausbildung räumlicher und nichträumlicher Gedächtnisinhalte wesentlich ist.

2.3.3. Expression

Zahlreiche Studien, die meist an Ratten durchgeführt wurden, liefern ein detailliertes Bild über die regionale Verteilung der verschiedenen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors im ZNS. Bei Ratten wird die NR1-Untereinheit ubiquitär in allen Hirnarealen exprimiert, vorwiegend jedoch im zerebralen Kortex, Hippocampus, olfaktorischen Bulbus, Thalamus, Striatum, Hirnstamm und Cerebellum. Aufgrund der ubiquitären Verteilung gehen Zukin et al. davon aus, dass die NR1-Untereinheit die grundlegende Komponente des Rezeptors darstellt (Zukin und Bennett 1995).

NR1-Untereinheiten ohne N-terminale Kasette (-Exon 5) wurden hauptsächlich im Hippocampus, Striatum und Cerebellum, die Spleißvarianten mit N-terminaler Kasette (+Exon 5) hauptsächlich im Cerebellum detektiert. Die Spleißvariante ohne N-terminale Kasette wird insgesamt im Vergleich zur Spleißvariante mit N-terminaler Kasette fünffach stärker exprimiert (Laurie 1995).

Die NR1-Spleißvarianten weisen regional unterschiedliche Expressionsmuster auf, deren hirregionsspezifische Expressionsrate sich im Laufe der Hirnentwicklung verändert. Im Kortex und Hippocampus existiert hauptsächlich NR1A (bzw. NR1-011)

und NR1E (bzw. NR1-000). Im adulten Cerebellum wurde hauptsächlich NR1G (bzw. NR1-100) gefunden (Sugihara et al. 1992; Zhong et al. 1995). Diese regionsspezifischen Variationen sind möglicherweise Ausdruck der unterschiedlichen Funktionen, die NMDA-Rezeptoren in verschiedenen Hirnregionen erfüllen müssen. Das deutet darauf hin, dass nicht nur die NR2- und NR3-Untereinheitenzusammensetzung des NMDA-Rezeptors für die biophysischen Eigenheiten eines Rezeptors verantwortlich ist, sondern dass auch die jeweiligen NR1-Spleißvarianten der NMDA-Rezeptoren diese Charakteristika mitbestimmen.

Die Expression der NR2-Untereinheit variiert stark nach Hirnregion und Alter. Im Embryonalstadium ist die NR2B-Untereinheit in nahezu allen Hirnarealen nachweisbar während die NR2D-Untereinheit fast ausschließlich im Diencephalon und Hirnstamm zu finden ist. Im Laufe der Entwicklung findet ein Wechsel von NR2B zu NR2A beinhaltenden NMDA-Rezeptoren statt (Ito 1997; Rumbaugh 1999).

2.3.4. Struktur

Der NMDA-Rezeptor besitzt eine heteromere Struktur, deren Multiproteinkomplex sich aus den Untereinheiten NR1 und NR2 (NR2A – NR2D) und möglicherweise NR3 (NR3A und NR3B) zusammensetzt. Diese sind zu ca. 20% homolog (Monyer et al. 1992; Dingledine et al. 1999; Yamakura und Shimoh 1999; Cull-Candy et al. 2001; Madden 2002). Die genaue Zusammensetzung des nativen NMDA-Rezeptors ist nicht endgültig geklärt.

Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass der native NMDA-Rezeptor aus vier (Tetramer) oder fünf (Pentamer) Untereinheiten aufgebaut ist (Laube et al. 1998). Dabei setzt er sich aus zwei NR1 und zwei bis drei NR2 (A-D) und NR3 (A-C) Untereinheiten zusammen (Abb. 6). Die NR1-Untereinheiten sind so aufgebaut, dass sie als Homomere funktionelle Ionenkanäle ausbilden können. NR2-Untereinheiten können hingegen keine funktionellen Ionenkanäle ausbilden; sie haben nur dann eine Funktion, wenn sie mit der NR1-Untereinheit koexprimiert werden. Durch die Kombination der NR1 Untereinheit mit verschiedenen NR2 und NR3 Untereinheiten entstehen funktionsfähige Rezeptorkomplexe, die sowohl

elektrophysiologisch als auch pharmakologisch variieren (Monyer et al. 1994; Yamakura und Shimoh 1999; Cull-Candy et al. 2001). Es gibt also eine Vielzahl möglicher Kombinationen von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten. Jeder Rezeptor weist, in Abhängigkeit von seiner Zusammensetzung, unterschiedliche Eigenschaften auf. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des NMDA-Rezeptorkomplexes ändern sich auch seine kinetischen, Permeabilitäts-, Ligandenbindungs- sowie Desensitisierungseigenschaften.

Aufgrund der funktionellen Unterschiede der NR2-Untereinheiten wird angenommen, dass sie, in Kombination mit den acht NR1-Isoformen, vorrangig die funktionelle Vielfalt der NMDA-Rezeptoren mitbestimmen. Dabei scheinen sie die Aktivität des Rezeptorkomplexes insgesamt zu erhöhen (Das et al. 1998; Premkumar und Auerbach 1997).

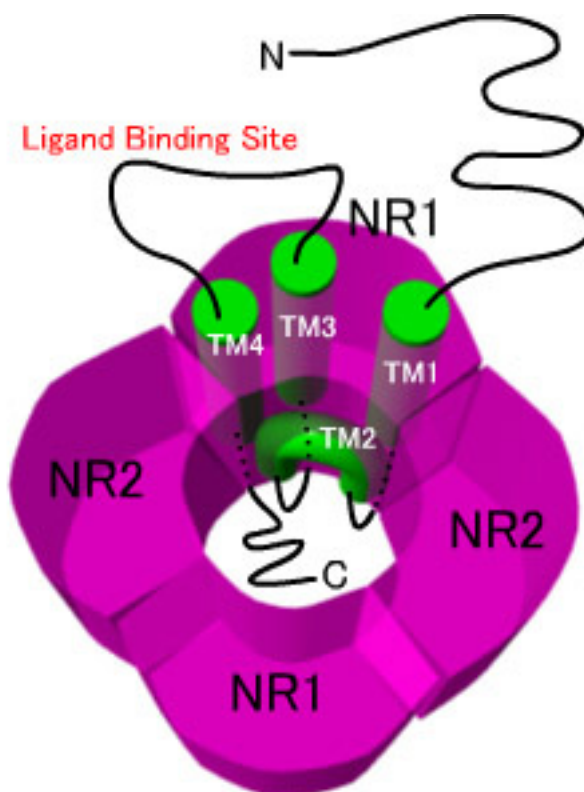


Abb. 6: Der Aufbau des NMDA-Rezeptors: Er besitzt eine heteromere Struktur, dessen Multiproteinkomplex sich aus den Untereinheiten NR1 und NR2 und möglicherweise NR3 zusammensetzt. Weiterhin existieren transmembrane Domänen (TM1 - TM4). C und N stellen jeweils das C-Terminal bzw. das N-Terminal dar.

Die Untereinheit NR1 wird vom Gen GRIN1 (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1) kodiert, welches auf Chromosom 9q34.3 lokalisiert ist (Karp 1993; Zimmer et al. 1995).

Die mRNA-Transkripte der GRIN1-Transkripte kodieren für Proteine mit einer Länge von ca. 900 (NR1) und sind teilweise posttranskriptionellen Veränderungen, wie dem alternativen Spleißen, unterworfen. Dies führt zu einer Expression funktionell sehr unterschiedlicher Proteine (Hollmann und Heinemann 1994).

Durch alternatives Spleißen entstehen aus der NR1-Untereinheit acht Isoformen bzw. Varianten (A-H). Unterschiede zwischen den Spleißvarianten finden sich durch die An- oder Abwesenheit von Exon 5 und den Exons 21 (C1-Terminal) und 22 (C2-Terminal) (Abb. 7). Dabei kodiert Exon 21 für 37 und Exon 22 für 38 Aminosäuren. Insgesamt besteht das NR1-Gen aus 22 Exons und 21 Introns (Behe et al. 1995; Dingledine et al. 1999; Hollmann et al. 1993; Dunah et al. 1999; Cull-Candy et al. 2001).

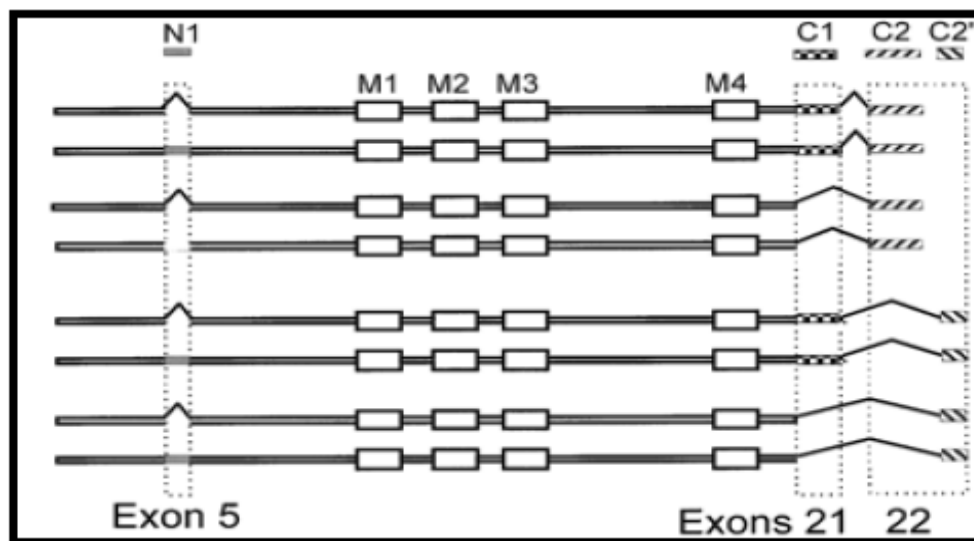


Abb. 7: Durch alternatives Spleißen der NR1 Untereinheit entstehen acht Isoformen bzw. Varianten. N1 = N1-Terminal ; C1 = C1-Terminal ; C2 = C2-Terminal ; M1-M4 = Membrane Domänen (Dingledine et al. 1999).

Das NR1-Protein besteht aus einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne und zwei extrazellulären Segmenten (S1 und S2), die wahrscheinlich die Bindungsstellen

für Glycin und Glutamat darstellen. Das intrazelluläre C-terminale Ende beinhaltet vier oder fünf Bereiche, die von der Proteinkinase C phosphoryliert werden (Tingley WG et al. 1997). Weiterhin existieren drei transmembrane Domänen (TM1, TM3, TM4) und ein viertes hydrophobes Segment, welches in Form einer Haarnadelschleife den Ionenkanal ausbildet (Abb. 8).

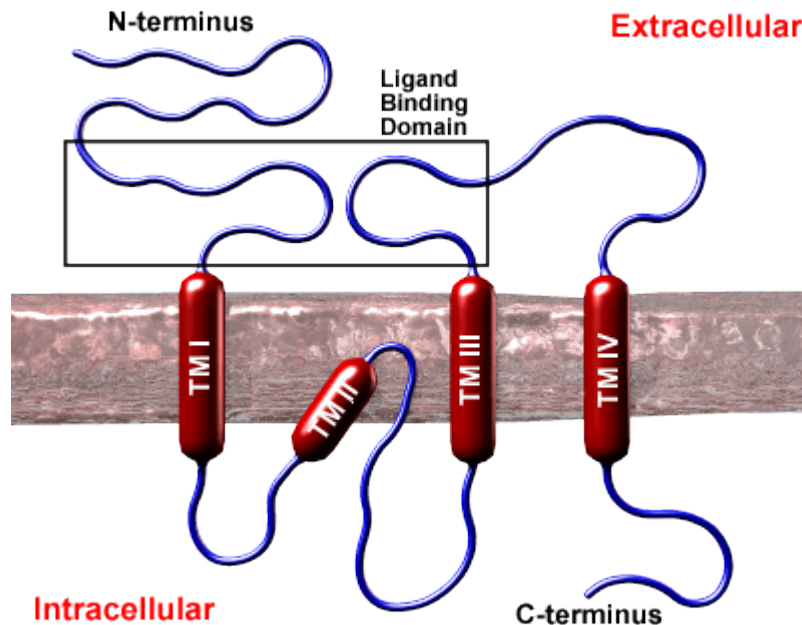


Abb. 8: Struktur und Spleißvariationen der NR1 Untereinheit: Es existieren drei transmembrane Domänen (TM1, TM3, TM4) und ein viertes hydrophobes Segment TM2, welches in Form einer Haarnadelschleife den Ionenkanal ausbildet (MRC Centre for Synaptic Plasticity, Bristol).

2.3.5. Das NMDA-Rezeptor-Gen / GRIN1-Gen

Die Untereinheit NR1 wird vom NMDA-Rezeptor-Gen, auch GRIN1-Gen genannt, codiert. Es befindet sich telomernah auf dem langen Arm des Chromosom 9q34.3 (Abb. 9) (Karp et al. 1993; Zimmer et al. 1995). Da es im Laufe des Lebens zu Telomerverkürzungen und terminalen chromosomalen Strukturveränderungen kommen kann, könnte sich die Lage nahe des Telomers auf die Genexpression auswirken (Hastie et al. 1990). GRIN1 wurde bereits in verschiedenen Assoziationsstudien molekulargenetisch untersucht.

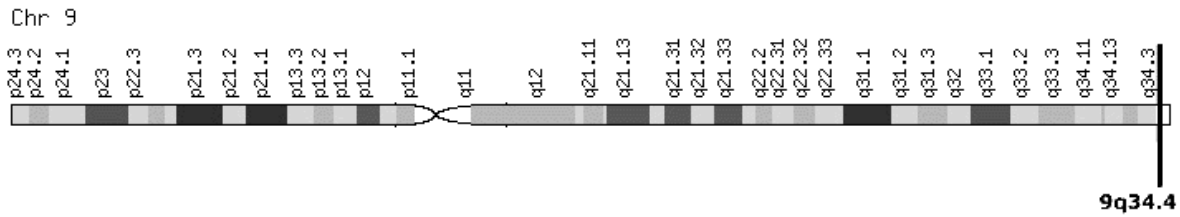


Abb. 9: Die Untereinheit NR1 wird vom Gen GRIN1 codiert, das sich telomernah auf dem langen Arm des Chromosom 9q34.3 befindet (NCBI 2010).

Einige Untersuchungen erwiesen signifikante Assoziationen von Polymorphismen des GRIN1 mit Schizophrenie.

Zhao et al. konnten eine hochsignifikante Assoziation am 5' Ende von GRIN1 feststellen. In dieser Studie wurden fünf SNPs in GRIN1 und zwei in GRIN2 genotypisiert. Als Probanden dienten 2455 Han-Chinesen, an denen eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt wurde. Vor allem das SNP rs11146020 zeigte eine starke Assoziation mit Schizophrenie. Diese Studie unterstützt die These, dass der NMDA-Rezeptor ein wichtiger Faktor für Schizophrenie ist und GRIN1 als gutes Kandidatengen angesehen werden kann (Zhao et al. 2006).

Ebenfalls an der chinesischen Population führten Qin et al. eine Assoziationsstudie durch. Dabei wurden 253 Patienten mit Schizophrenie einer Kontrollgruppe von 140 Probanden gegenübergestellt. Es konnte eine signifikante Interaktion zwischen G1001C im GRIN1-Gen und den Polymorphismen T4197C und T5988C im GRIN2B-Gen gefunden werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine kombinierte Wirkung der Polymorphismen der beiden Gene GRIN1 und GRIN2B auf Schizophrenie schließen (Qin et al. 2005).

Begni et al. führten eine ähnliche Assoziationsstudie in Italien durch, in der sie den G1001C Polymorphismus (rs11146020) analysierten. Hierbei wurden 139 italienische Schizophreniekranken mit 145 gesunden Probanden verglichen. Die gefundenen Assoziationen weisen auch hier auf GRIN1 als gutes Kandidatengen für Schizophrenie hin (Begni et al. 2003).

Eine signifikante Assoziation mit dem G1001C Polymorphismus (rs11146020) und Schizophrenie fanden auch Galehdari et al., die im Iran eine Kohortenstudie mit 200 Patienten und 200 Kontrollpersonen durchführten (Galehdari et al. 2009).

In einer in Deutschland durchgeführten Studie konnten Georgi et al. Assoziationen zwischen Schizophrenie und den Basenaustauschpolymorphismen rs4880213, rs11146020, rs6293 und rs10747050 belegen, wobei eine stärkere Signifikanz bei Patienten mit affektiver Psychose festgestellt wurde. Die Untersuchung wurde an 354 Patienten und einer Kontrollgruppe von 323 Probanden durchgeführt (Georgi et al. 2007).

Ebenfalls in Deutschland erforschten Paus et al. zwei codierende SNPs auf Exon 6 und 7 und zwei SNPs auf Intronsequenzen, konnten dagegen aber keine Assoziationen zwischen den Polymorphismen und der Erkrankung feststellen. Hier wurde unter anderem der SNP V285V (rs1126442), der auch in dieser Arbeit analysiert wird, untersucht. Paus et al. kamen daher zu dem Ergebnis, dass die NR1-Untereinheit in der deutschen Bevölkerung keinen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung der Schizophrenie besitzt (Paus et al. 2004).

Zum selben Schluss kamen auch Sakurai et al., die 48 japanische Schizophreniepatienten auf Mutationen screenen und die Varianten IVS2-22T>C, IVS2-12G>A, IVS4-34C>T und 1719G/A (Pro516Pro) identifizierten. In einer Fall-Kontroll-Studie konnten sie keine Assoziationen feststellen (Sakurai et al. 2000).

Auch Williams et al., die alle bis zum damaligen Zeitpunkt detektierten SNPs des NMDA-Rezeptor-Gens in einer Fall-Kontroll-Studie in der kaukasischen Bevölkerung Großbritanniens auf Assoziationen mit Schizophrenie testeten, konnten keinen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und der GRIN-Gene finden. Auch sie testeten unter anderem den in dieser Arbeit analysierten Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) (Williams et al. 2002).

Nachdem entdeckt wurde, dass die beiden am häufigsten verwendeten Stimmungsstabilisatoren Lithium und Valproat über das NMDA-Rezeptor-System wirken, testeten Mundo et al. die Assoziation der Polymorphismen 1001-G/C, 1970-A/G und 6608-G/C des GRIN1-Gens mit bipolaren Erkrankungen. Die stärkste Assoziation konnte hier bei den Haplotypen 1001G-1970A-6608A und 1001G-1970A-

6608G festgestellt werden. Ein Einfluss des GRIN1-Gens auf bipolare Erkrankungen wird deshalb vermutet (Mundo et al. 2003).

Im Gegensatz dazu konnten von Georgi et al. keine signifikanten Assoziationen von GRIN1 und bipolaren Störungen gefunden werden. Sie führten die Studie an der deutschen Bevölkerung mit 306 Patienten und 319 Kontrollpersonen durch (Georgi et al. 2006).

Desweiteren konnten Rujescu et al. einen Zusammenhang von GRIN1 mit Alkoholabhängigkeit finden. Hier wurden in zwei unabhängigen Fall-Kontroll-Studien insgesamt 442 alkoholabhängige Patienten und 442 Kontrollpersonen eingeschlossen. Dabei zeigten Träger des 2108A-Allels und A-enthaltende Genotypen eine erhöhte Anfälligkeit für alkoholentzugsbedingten Krampfanfälle (Rujescu et al. 2005).

Insgesamt kann GRIN1 als interessantes Kandidatengen für Schizophrenie, bipolare Störungen und Alkoholabhängigkeit angesehen werden.

Da bei psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere bei Schizophrenie (Randolph et al. 1993; Mohamed et al. 1999; Cirillo und Seidman 2003; Skelley et al. 2008; Perry et al. 2000; Huguelet et al. 2002), regelmäßig kognitive Leistungen betroffen sind, ist es denkbar, dass Polymorphismen des GRIN1-Gens auch bei Gesunden einen Einfluss auf Kognition und Intelligenz haben (Aylward et al. 1984).

3. Fragestellung

Durch verschiedene Studien wurde erwiesen, dass Kognition und Intelligenz wesentlich von genetischen Anlagen beeinflusst werden (Plomin et al. 1999; Boomsma et al. 1993). Zahlreiche Studien belegen, dass der NMDA-Rezeptor dabei eine wichtige Rolle spielt. Die genauen Zusammenhänge sind bisher noch nicht bekannt (Morris et al. 1986; Roberts et al. 2002; Shapiro et al. 1999; Tsien et al. 1996; McHugh et al. 1996).

Das GRIN1-Gen wurde im Literaturüberblick als interessantes Kandidatengen der Schizophrenie ausgewiesen. In verschiedenen Studien konnten Assoziationen von Polymorphismen des GRIN1-Gens mit Schizophrenie (Zhao et al. 2006; Qin et al. 2005; Begni et al. 2003; Georgi et al. 2007), bipolaren Erkrankungen (Mundo et al. 2003) und Alkoholabhängigkeit (Rujescu et al. 2005) ermittelt werden. Da bei psychiatrischen Erkrankungen oft kognitive Leistungen beeinträchtigt sind, wird in dieser Arbeit die These aufgestellt, dass Polymorphismen des GRIN1-Gens auch bei Gesunden einen Einfluss auf Kognition und Intelligenz haben (Aylward et al. 1984).

Ziel dieser Studie ist, Assoziationen zwischen einem Polymorphismus des GRIN1-Gens mit kognitiven Fähigkeiten zu untersuchen. Hierfür wurde das SNP V285V (rs1126442) ausgewählt und die Allel- und Genotypfrequenzen bestimmt. Diese werden jeweils zu Gesamt-IQ, Handlungs-IQ, Verbal-IQ und den Ergebnissen der verschiedenen Untertests des HAWIE-R, gemessen an 294 randomisiert ausgewählten, neuropsychiatrisch gesunden Probanden, in Beziehung gesetzt.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Geräte

Tab. 1: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waagen	Explorer	Ohaus Corporation, USA
	PRECISA 1620 C	PRECISA Instruments AG, Dietikon
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	PP-Röhrchen steril	Greiner Labortechnik
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
	Mastercycler	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Tiefkühlschrank	Economic (– 20 °C)	Bosch, München
Ultra-Tiefkühlschrank	U725	New Brunswick Scientific
Pipetten		Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Gelkammer	Wide Mini Sub Cell GT, Agarose Gel Electrophoresis Systems	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Spannungsquelle	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eagle Eye	Eagle Eye II Photosystem	Stratagene, La Jolla, USA
Photometer	Genequant	Pharmacia Biotech
Wasserbad	WB 14	Memmert GmbH u. CoKG,

		Schwabhausen
Mikrowelle	Privileg 9024 E	Privileg
Vortexer	Reax	Heidolph

4.1.2. Software

Tab. 2: Software

Anwendung	Software	Hersteller/ Internetadresse
Statistische Auswertung	SPSS 14.0	Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA
SNP Suche	SNPper	http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter
Primer Spezifität	Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Primerdesign	Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

4.1.3. Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
QIAamp DNA Blood Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Streptokinase	QIAGEN GmbH, Hilden
H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
dNTP 10 mM	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Primer	Fa. Life Technologies, Karlsruhe
BseRI-Restriktionsenzym (10.000 U/ml) (5' UTR)	New England Biolabs, Frankfurt
Btg I-Restriktionsenzym (10.000 U/ml) (Exon 7)	New England Biolabs, Frankfurt

Taq-DNA-Polymerase (rekombinant) 1 U / μ l	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
10 x NEB-Puffer 4	New England Biolabs, Frankfurt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalzdihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid Solution 10 mg /ml	Bio Rad Laboratories GmbH, München
DNA-Ladder 100 bp, 0,5 mg DNA /ml	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
30% Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

4.1.4. Oligonukleotide

Tab. 4: Oligonukleotide

Name	Orientierung	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
nm1ex7f4	forward	GTG GGA GTG CTG GAG TCC T	rs1126442
nm1ex7r4	reverse	GGT CGG TGA TGT TCT CCT TC	rs1126442

4.1.5. Polymorphismus

Tab. 5: Polymorphismus

Gen	Accession Nr.	SNP	Position	Allel	Funktion
Grin 1	Z32744	rs1126442	17438	A/G	Exon 7

4.2. Probandenrekrutierung

Die Studiengruppe umfasste 294 nicht verwandte Freiwillige ethnisch-deutscher Herkunft aus der allgemeinen Bevölkerung. Davon waren 55% der Teilnehmer weiblichen und 45% männlichen Geschlechts.

Die Probandenrekrutierung erfolgte in mehreren Stufen. Zunächst wurden durch Zufallsprinzip auserwählte Einwohner des Raums München per Post kontaktiert. Bei Probanden, die auf das randomisierte Anschreiben hin Interesse an der Studie gezeigt hatten, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um neuropsychiatrische Störungen der Probanden und deren Verwandten ersten Grades im Vorfeld abzuklären und auszuschließen.

Zuerst wurde ein standardisiertes Telefonscreening mit 15 Fragen zur Erfassung der definierten Ausschlusskriterien angewendet. Gezielt erfasst wurden hierbei derzeitige Medikamenteneinnahme, Hinweise auf depressive und/oder manische Störungen, Alkohol- und Drogenanamnese, Medikamentenabusus, Angst- und Essstörungen, bisherige neurologische und psychiatrische Therapien sowie Suizidversuche. Dieselben Daten wurden für die Blutsverwandtschaft erfragt. Außerdem wurde die ethnische Zugehörigkeit ermittelt.

Lagen keine Hinweise auf eine neuropsychiatrische Erkrankung vor, wurde den potentiellen Studienteilnehmern ein umfassender schriftlicher Fragebogen zur Erfassung der medizinischen und psychiatrischen Krankheitsvorgeschichte gesendet. Stellte sich das zurückgesendete Anamneseformular weiterhin als neuropsychiatrisch unauffällig heraus wurden die Teilnehmer zu einem umfassenden Interview eingeladen.

Hier wurden sie dem Strukturierten Klinischem Interview (SKID) für DSM-IV (SKID I und SKID II) sowie dem Family History Assessment Modules (FHAM) unterzogen. Zusätzlich wurde eine ausführliche körperliche Untersuchung sowie bei Probanden über 60 Jahren der Mini Mental State Test durchgeführt. Testpersonen mit relevanten somatischen Krankheiten oder Achse I/II-Störungen (lifetime) wurden während des Interviews ausgeschlossen. Ebenso erfolgte ein Ausschluss bei positiver psychiatrischer Familienanamnese.

4.3. Angewandte Tests zum Ausschluss psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen

4.3.1. Körperliche Untersuchung

Anamnestisch wurden studienrelevante Vorerkrankungen und Einschränkungen der Sinnesorgane erhoben. Weitergehend wurden Hörtest (Fingerraspeln) und Manumotorik (Händeschütteln, Fingerspreizen, Gegenhalten) durchgeführt. Die neurologische Untersuchung umfasste Überprüfung von Parkinsonzeichen, Gehirnnerventestung, Durchgängigkeit der Reflexe sowie Koordinationsprüfungen (Finger-Nase-Versuch, Finger-Finger-Versuch, Romberg-Stehversuch, Seiltänzerengang).

4.3.2. Mini Mental State Test - MMST

Der Mini Mental State Test (MMST) stellt ein Screening-Instrument zur Erfassung kognitiver Störungen bei älteren Personen dar. Es handelt sich um ein Interview mit Handlungsaufgaben, das vor allem praxisnahe Fragen beinhaltet, die von kognitiv nicht beeinträchtigten Personen im Regelfall problemlos beantwortbar sind, von Personen mit Demenzverdacht dagegen nur zum Teil bewältigt werden. Erfasst werden folgende kognitive Aspekte: Orientierung, Aufnahmefähigkeit, Aufmerksamkeit, Rechnen, Gedächtnis, Sprache, Ausführung einer Anweisung, Lesen, Schreiben und konstruktive Praxie (Folstein et al. 1975; Folstein et al. 1983).

Maximal können 30 Punkte erreicht werden. Teilnehmer, die eine Punktzahl von 26 oder weniger erreichten, wurden aus der Studiengruppe ausgeschlossen.

4.3.3. Strukturiertes Klinisches Interview - SKID

Bei der deutschen Version des Strukturierten Klinischen Interviews (SKID) handelt es sich um ein semistrukturiertes klinisches Interview, das zum Ziel hat, gemäß der Klassifikation des Diagnostic and Statistical Manuals of Mental Disorders (DSM-IV), Symptome, Syndrome und Diagnosen abzuleiten (First et al. 1997; Wittchen et al. 1997).

Das SKID lässt sich in Achse I und II einteilen, wobei SKID I den Kernpunkt darstellt. Das SKID lässt sich in eine Forschungs- und Klinik-Version gliedern. Die von uns angewandte Klinik-Version des SKID I wurde zur Qualitätssicherung einer standardisierten diagnostischen Beurteilung entwickelt.

SKID I berücksichtigt alle DSM-IV-Diagnosen, welche besonders häufig in der klinischen Praxis anzutreffen sind wie: Affektive Störungen, psychotische Störungen, Substanzmissbrauch- und Substanzabhängigkeit, Angststörungen, somatoforme Störungen, Essstörungen und Anpassungsstörungen.

Im Wesentlichen stellt SKID I fest, ob irgendwann im Leben eine Achse I Störung bestand bzw. ob Symptome dieser Störung im letzten Monat auftraten. Für einige Störungen erfolgen auch Einschätzungen über Dauer oder Schwere mittels eigener Skalen. SKID II bildet darüber hinaus ein eigenständiges Zusatzinterview zur Aufdeckung von Persönlichkeitsstörungen (Saß et al. 1998).

Begonnen wird mit einem kurzen Explorationsleitfaden, der einen Überblick über momentane und frühere Beschwerden des Probanden ermöglicht und die Erstellung einer vorläufigen Differentialdiagnose gestattet. Im Anschluss an diesen Kurzüberblick beginnt dann das strukturierte Interview, in welchem der Proband anhand offener Fragen die Möglichkeit zu einer ausführlicheren Symptombeschreibung erhält. Codiert wird dann das diagnostische Kriterium, auch wenn es sich nicht mit der Einschätzung des Probanden deckt. Die klinische Entscheidung stellt also der Untersucher.

Tab. 6: Module des Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-IV

SKID-I (DSM-IV Achse I Störungen)	SKID-II (Persönlichkeitsstörungen)
Affektive Störungen	Selbstunsichere Persönlichkeitsstörung
Psychotische Störungen	Dependente Persönlichkeitsstörung
Störungen durch psychotrope Substanzen	Zwanghafte Persönlichkeitsstörung
Angststörungen	Negativistische Persönlichkeitsstörung
Somatoforme Störungen	Depressive Persönlichkeitsstörung
Essstörungen	Paranoide Persönlichkeitsstörung
Anpassungsstörungen	Schizotypische Persönlichkeitsstörung
	Schizoide Persönlichkeitsstörung
	Histrionische Persönlichkeitsstörung
	Narzistische Persönlichkeitsstörung
	Borderline-Persönlichkeitsstörung
	Antisoziale Persönlichkeitsstörung

SKID I und II erlauben die Erhebung und Diagnostik ausgewählter psychischer Syndrome und Störungen gemäß der Definition des Statistischen Manual für Psychische Störungen (Tab. 6).

Studien zu Anwendbarkeit, Reliabilität und Effizienz liegen für SKID mit befriedigenden Resultaten vor (Williams et al. 1992).

4.3.4. Family History Assessment Modules - FHAM

Das FHAM (Family History Assessment Modules) ist ein standardisierter Fragebogen, mit dem sich psychiatrische Erkrankungen in der Blutsverwandtschaft 1. bis 3. Grades der Probanden ausschließen lassen. Erfragt werden

Alkoholkrankheit, Drogen- oder Medikamentenabusus, Depression, Manie, Schizophrenie, antisoziale Tendenzen, neurotische Störungen, psychiatrische Behandlungen, sowohl ambulant als auch stationär, Suizidversuche sowie vollendete Suizide (Rice et al. 1995).

4.4. Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene – HAWIE-R

Zur Messung der kognitiven Leistungen der Probanden wurde der Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene – Revision 1991 (HAWIE-R) verwendet.

Der HAWIE-R orientiert sich am faktorenanalytischen Modell Spearman's und zählt heute zu den weitverbreitetsten Intelligenztests. Er weist eine hohe Validität und Stabilität in allen Altersgruppen auf. Er liefert eine gute Messung vom Intelligenz-Generalfaktor ‚g‘ und repräsentiert im Handlungsteil sowohl fluide als auch kristalline Intelligenz, im Wortschatzteile vor allem kristalline Intelligenz (Duncan et al. 1995; Woodcock 1990).

4.4.1. Allgemeine Beschreibung

Der HAWIE-R besteht aus 11 Untertests, die sich aus 6 Verbaltests und 5 Handlungstests zusammensetzen. Die Prüfung der sprachlichen Intelligenz erfolgt durch die Untertests Allgemeines Wissen, Zahlennachsprechen, Wortschatztest, Rechnerisches Denken, Allgemeines Verständnis sowie Gemeinsamkeiten finden. Die praktische Intelligenz wird durch die Untertests Bilderergänzen, Bilderordnen, Mosaik-Test, Figurenlegen und Zahlen-Symbol-Test erhoben (Tab. 7).

Tab. 7: HAWIE-Untertests

Verbalteil	Handlungsteil
Allgemeines Wissen	Bilderergänzen
Zahlennachsprechen	Bilderordnen
Wortschatztest	Mosaik-Test
Rechnerisches Denken	Figurenlegen
Allgemeines Verständnis	Zahlen-Symbol-Test
Gemeinsamkeitenfinden	

4.4.2. Untertests

4.4.2.1. Verbalteil

Allgemeines Wissen

Der Untertest „Allgemeines Wissen“ prüft Wissen, das sich ein Durchschnittsmensch mit durchschnittlichen Bildungsmöglichkeiten selbst aneignen kann (Matarazzo 1982). Die Leistung in diesem Untertest ist in beträchtlichem Maße von Bildung und kulturellen Erfahrungen des Probanden abhängig. Trotzdem ist dieser Untertest ein recht guter Indikator seiner intellektuellen Kapazitäten, weil das allgemeine Wissensniveau die Aufgeschlossenheit der Person gegenüber der Umwelt widerspiegelt. Die Wissensbereiche, die durch diesen Untertest erfasst werden, sind bewusst sehr heterogen gehalten (Wechsler 1964).

Beispiel: Woraus gewinnt man Gummi? ; Auf welchem Kontinent liegt die Wüste Gobi?

Zahlennachsprechen

Im Test „Zahlennachsprechen“ werden vom Testleiter vorgesprochene Zahlenreihen unterschiedlicher Länge vom Probanden nachgesprochen, erst vorwärts dann rückwärts. Ein gutes Zahlengedächtnis erscheint dabei nur von geringer Bedeutung zu sein. Leistungsausfälle in diesem Untertest sind allerdings klinisch bedeutsam, da Probanden mit speziellen Defekten und hirnnorganischen Erkrankungen selten gute Leistungen erbringen. Schlechte Leistungen können auch auf Aufmerksamkeitsstörungen oder erhöhte Testangst zurückzuführen sein (Wechsler 1964).

Wortschatztest

Im „Wortschatztest“ werden einzelne Wörter vom Probanden umschrieben, erklärt oder Synonyme dafür gefunden. Die Leistung gilt hier als exzellentes Maß für die allgemeine Intelligenz und als gutes Maß für die Lernfähigkeit und Informationsbreite einer Person, welche weitgehend unabhängig vom Lebensalter ist (Wechsler 1964).

Beispiel: Was bedeutet ‚anonym‘? Was bedeutet ‚Determinante‘?

Rechnerisches Denken

Das Ergebnis von „Rechnerisches Denken“, in welchem Rechentextaufgaben vom Probanden ohne Hilfsmaßnahmen wie Schreibmaterial oder Taschenrechner gelöst werden müssen, ist ein gutes Maß für die geistige Beweglichkeit und ein gutes allgemeines Intelligenzmaß. Die Leistungen sind jedoch in starkem Maße abhängig von schulischer und beruflicher Erfahrung. Niedrige Testwerte könnten auch auf gemindertes Konzentrationsvermögen und geringe Belastbarkeit zurückgeführt werden (Rappaport 1953).

Beispiel: Ein Zug fährt 275 km in 5 Stunden. Wie groß ist seine Durchschnittsgeschwindigkeit in km pro Stunde?

Allgemeines Verständnis

Im Test „Allgemeines Verständnis“ werden allgemeine Fragen gestellt, die mit gesundem Menschenverstand zu lösen sind. Insbesondere erfasst er die generelle Fähigkeit, Erfahrungen zu verwerten und logisch zu denken. Bei der Lösung der Aufgaben lassen sich auf das praktische Urteilsvermögen und auf die Fähigkeit, aus Erfahrung zu lernen und in Ursache-Wirkungs-Zusammenhängen zu denken, Rückschlüsse ziehen (Wechsler 1964).

Beispiel: Warum müssen viele Nahrungsmittel gekocht werden?

Gemeinsamkeitenfinden

Der Testleiter gibt jeweils zwei Wörter an, für die eine Gemeinsamkeit bzw. ein Überbegriff gefunden werden soll. Dieser Untertest gibt Auskunft über die logische Struktur der Denkprozesse und erlaubt Unterscheidungen zwischen wesentlichen und oberflächlichen Denkprozessen. Insgesamt ist zu vermuten, dass dieser Test vor allem das sprachliche Abstraktionsvermögen erfasst. Er lässt auch qualitative Deutungen bei klinisch auffälligen Probanden zu. So sind beispielsweise bei schizophrenen Patienten häufig übergeneralisierende Antworten zu beobachten (Wechsler 1964).

Beispiel: Buch – Fernseher; Fliege – Baum

4.4.2.2. Handlungsteil

Bildergänzen

In der Aufgabe „Bilderergänzen“ werden verschiedene Bilder vorgelegt, auf denen jeweils ein wichtiges Element fehlt, welches der Proband erkennen soll. Dieser Test prüft im weitesten Sinne die Fähigkeit, zwischen wichtigen und unwichtigen Details bei visuellen Vorlagen zu unterscheiden. Er erfasst die der Wahrnehmung und Begriffsbildung zugrundeliegenden Fähigkeiten. Im visuellen Bereich testet er die

Fähigkeit zur Identifikation bekannter Gegenstände und differenziert dabei in erster Linie im unteren Intelligenzbereich (Wechsler 1964).

Bilderordnen

Verschiedene Bilder, die richtig aneinandergereiht eine logische Geschichte ergeben, werden dem Probanden vermischt vorgelegt. Er soll in möglichst kurzer Zeit die Kärtchen in die richtige Reihenfolge bringen. Der Test ‚Bilderordnen‘ erfasst die Fähigkeit des Probanden, Gesamtsituationen zu verstehen und Einzelaspekte hinsichtlich ihrer Bedeutung richtig einzuschätzen. Er misst Aspekte der sozialen Intelligenz und die Fähigkeit, komplexe Situationen zu erfassen und zu bewältigen (Wechsler 1964).

Mosaik-Test

Im Mosaik-Test werden dem Probanden Würfel mit verschiedenartig bemalten Seitenflächen vorgelegt. Er soll damit in möglichst kurzer Zeit Grafiken nachbilden, die vom Testleiter vorgegeben werden. Geprüft wird hierbei die Fähigkeit, Formen wahrzunehmen, sie zu analysieren und das Ganze in seine Komponenten zu zerlegen (Matarazzo 1982). Auch für die klinische Diagnostik ist dieser Test valide, da demente Patienten deutlich schlechtere Leistungen erbringen und Patienten mit Hirnverletzungen andere Lösungsstrategien wählen als Gesunde (Wechsler 1964).

Figurenlegen

Beim „Figurenlegen“ sollen verschiedene Puzzleteile möglichst schnell zu sinnvollen Figuren zusammengelegt werden. Dieser Test soll die Vertrautheit mit Formen und die Fähigkeit, Relationen zwischen Teil und Ganzem herzustellen, erfassen. Er differenziert schlecht in den höheren Intelligenzbereichen, gibt aber gute qualitative Hinweise auf den Arbeitsstil des Probanden (Wechsler 1964).

Zahlen-Symbol-Test

Der Zahlen-Symbol-Test erfasst die allgemeine psychomotorische Geschwindigkeit und ist ein gutes Maß für das Konzentrationsvermögen, wobei die Ergebnisse altersabhängig sind. Probanden mit geringer emotionaler Belastbarkeit erzielen dabei häufig schlechtere Ergebnisse als Gesunde (Wechsler 1964).

Tab. 8: HAWIE-Untertests und deren Kognitionsbereiche

Untertest	Kognitionsbereich
Allgemeines Wissen	Sprachverständnis
Zahlennachsprechen	Arbeitsgedächtnis
Wortschatztest	Sprachverständnis
Rechnerisches Denken	Arbeitsgedächtnis
Allgemeines Verständnis	Sprachverständnis
Gemeinsamkeitenfinden	Sprachverständnis
Bildergänzen	Wahrnehmungsvermögen
Bilderordnen	Wahrnehmungsvermögen
Mosaik-Test	Wahrnehmungsvermögen
Figurenlegen	Wahrnehmungsvermögen
Zahlen-Symbol-Test	Bearbeitungsgeschwindigkeit

Eine Validitätsstudie ergab, dass die Ergebnisse der Untertests eng korrelieren, also Menschen, die in einem Untertest gut abschneiden, tendenziell auch in allen anderen Untertests gute Ergebnisse erreichen.

Eine Analyse dieser Daten identifizierte vier verschiedene, diesen Tests zugrunde liegende, Kognitionsbereiche: Sprachverständnis, Wahrnehmungsvermögen, Arbeitsgedächtnis und Bearbeitungsgeschwindigkeit (Tab. 8) (Deary 2001).

4.4.3. Durchführung

Der HAWIE-R wird als Einzeltest durchgeführt, die durchschnittliche Dauer beträgt 60 bis 90 Minuten. Das Testhandbuch enthält die Testanweisungen, die möglichst wörtlich wiedergegeben werden sollen. Der Protokollbogen enthält Angaben zu Abbruchkriterien und Bewertung der einzelnen Untertests. Für mehrere Untertests sind Zeitgrenzen angegeben.

Der Testleiter soll eine Beziehung herstellen, die den Probanden eher ermutigt, ihn jedoch nicht unter Druck setzt. Der Proband soll dabei das Gefühl haben, dass ihm die Gelegenheit geboten wird, sein Leistungsvermögen unter guten Bedingungen unter Beweis zu stellen.

4.4.4. Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgt nach festgelegten Kriterien, die sowohl in der Testanweisung als auch im Protokollbogen aufgeführt sind.

Die Leistungen in den verschiedenen Untertests werden zunächst als Rohpunkte auf Skalen verschiedener Länge quantifiziert und anschließend in Wertpunkte umgerechnet, wodurch die Vergleichbarkeit der einzelnen Untertests gewährleistet ist. Der Mittelwert der Wertpunkteskala beträgt 10, die Standardabweichung 3 Punkte. Die Leistungen im Verbalteil, Handlungsteil und Gesamttest sind auf einer Skala mit dem Mittelwert 100 und der Standardabweichung 15 festgelegt.

Der Gesamt-IQ spiegelt das geistige Leistungsvermögen des Probanden wider. Unterschiede zwischen Verbal- und Handlungsteil erlauben eine Aussage darüber, ob sprachliche oder verbal-theoretische Fähigkeiten dominieren. Die Ergebnisse sollten jedoch stets unter Berücksichtigung milieuspezifischer sowie krankheitsbedingter Einflüsse interpretiert werden (Wechsler 1964).

4.4.5. Anwendungsbereiche

Der HAWIE-R ist für Personen zwischen 16 und 74 Jahren konstruiert. Er wurde in erster Linie für die klinisch-psychologische Diagnostik entwickelt, bei der es um die Untersuchung von Ausfallserscheinungen geht. Der Test differenziert zufriedenstellend bis zu zwei Standardabweichungen über dem Erwartungswert von 100 IQ-Punkten. IQ-Werte über 150 werden im Handbuch nicht mehr aufgeführt. Im unteren Leistungsbereich differenziert der Test besser, so dass quantitative Vergleiche bis zu drei Standardabweichungen unter dem Erwartungswert, also bis zu einem IQ von 55 Punkten möglich sind (Matarazzo 1982).

4.4.6. Gütekriterien

Durch den HAWIE-R lassen sich sowohl der Gesamt-IQ, nebst einer Profilanalyse aller Untertests, als auch ein Abbauquotient (mittels altersbeständigen vs. nicht-altersbeständigen Untertests) ermitteln.

Zur Sicherung der Validität wurden Korrelationen zwischen den Untertests für jede Altersgruppe getrennt berechnet. Außerdem wird die Durchschnittskorrelation über alle Altersgruppen nach z'-Transformation ermittelt. Diese lineare Transformation ermöglicht direkte Vergleiche zwischen Erhebungen oder Tests mit voneinander abweichenden Mittelwerten und Standardabweichungen.

Untersuchungen zur Reliabilität liegen vor, wobei die inneren Konsistenzen der Untertests zwischen $r = 71$ und $r = 96$ liegen (Handlungsteil $r = 90$, Verbal- und Gesamtteil $r = 96$) (Matarazzo 1982).

4.4.7. Normen

Der HAWIE-R wurde an einer Stichprobe von $N = 2000$ Personen geeicht. Die Stichprobe ist in neun Altersgruppen unterteilt, die mit unterschiedlicher Häufigkeit besetzt sind. Der Umfang der altersspezifischen Stichproben bewegt sich zwischen je 300 Probanden in den Altersgruppen von 20 bis 24 und 25 bis 34 Jahren und 200 Probanden in den restlichen 7 Altersgruppen.

Die Zusammensetzung der Normierungsstichprobe orientiert sich an repräsentativen Angaben des Statistischen Bundesamtes zu Alter, Geschlecht und Schulbildung, die 1986 in den alten Bundesländern erhoben wurden (Wechsler 1964).

4.5. DNA-Extraktion

Von allen Probanden wurde Blut venös abgenommen und bei -80°C gelagert. Durch Zugabe von EDTA wurde die Gerinnung des gewonnenen Blutes verhindert. Aus 10 ml EDTA-Blut erfolgte mittels eines Kits der Firma Qiagen gemäß der gegebenen Anleitung die Extraktion der genomischen DNA (Abb. 10).

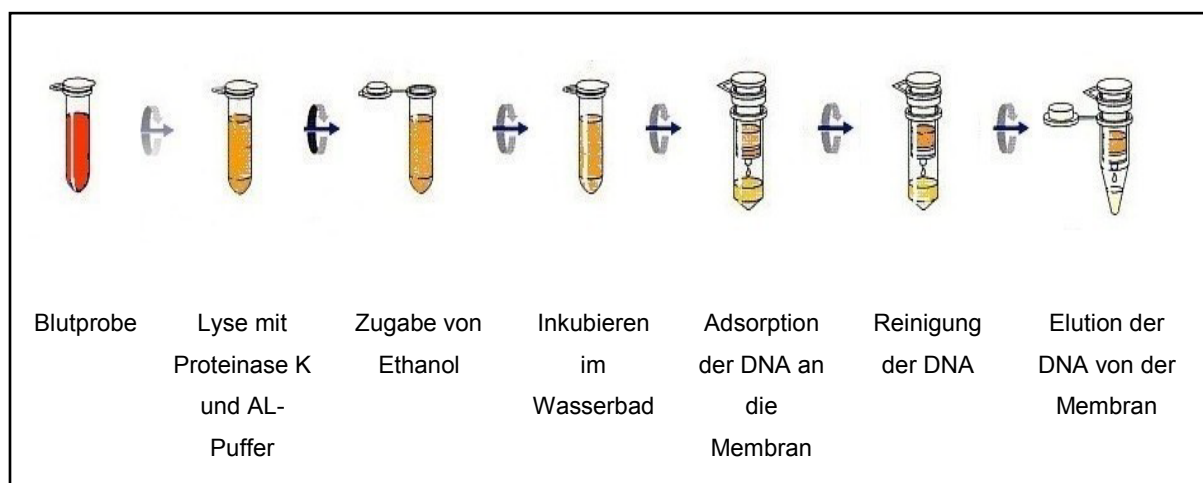


Abb. 10: DNA-Extraktion gemäß der Anleitung des QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Kit Handbook (Firma Quiagen, Hilden, Germany)

Das bei -80°C tiefgefrorene Blut wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils 5 - 10 ml Blut in ein 50 ml großes Zentrifugenröhrchen pipettiert.

4.5.1. Zelllyse

Um die Leukozyten zu lysieren und Nukleinsäuren freizusetzen, wurde Vollblut mit 500 μl Proteinase K versetzt und mittels eines Vortexers kurz vermischt. Die Proteinase K kann dann die Proteine, besonders Hämoglobin, Nukleasen und Histone, die später die PCR stören könnten, verdauen. Sie degradiert die denaturierten Proteine zu kleineren Fragmenten, die leichter von der DNA abgetrennt werden können.

Zu dieser Lösung erfolgte nun eine Zugabe von 12 ml AL-Puffer (Guanidin-HCL). Der AL-Puffer schafft optimale Reaktionsbedingungen für die Lyseeigenschaften der Proteinkinase K. Außerdem entzieht er der DNA die Hydrathülle, damit sie später an die Silikagel-Säule binden kann. Für die vollständige Zelllyse wurde daraufhin die Lösung 2 Minuten lang auf dem Vortexer durchgemischt.

Für einen maximalen DNA-Ertrag erfolgte dann eine mindestens 30 Minuten lange Inkubation der Lösung im Wasserbad bei 70°C unter gleichzeitigem Schütteln.

4.5.2. Adsorption der DNA an die Silikagel-Membran

Um die DNA auf das Säulenmaterial zu fällen wurde 10 ml Ethanol (96 - 100%) in die Probe gegeben. Anschließend erfolgte eine 2 minütige Vermischung auf dem Vortexer. Ca. ein Drittel der DNA-Lösung wurde dann auf die Silikagel-Säule überführt und für 3 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3 mal durchgeführt, da eine Säule nicht ausreichend ist, um die gesamte DNA-Lösung auf einmal aufzunehmen. Die DNA bindet so an die Silikamembran während Salz- und pH-Bedingungen dafür sorgen,

dass RNA und nukleinsäurebindende Proteine, die die PCR später stören könnten, nicht gebunden werden. Das Filtrat wurde jeweils verworfen.

4.5.3. Reinigung der DNA durch Waschen von Verunreinigungen von der Säule

Zur nochmaligen Entfernung von Proteinen wurden 5 ml Waschpuffer AW 1, der Guanidin-HCL enthält, auf den DNA-haltigen Filter gegeben und für 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert.

Zur Elimination von Guanidiniumsalze wurden 5 ml ethanolhaltiger Waschpuffer AW 2 auf den Filter zugegeben und eine 15-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm durchgeführt.

4.5.4. Elution der DNA von der Silikamembran

Anschließend erfolgte die Überführung der Filter in sterile Falcon-Röhrchen. Die Elution wurde unter Zugabe von 1 ml AE-Puffer (Tris-Puffer, pH > 9,0) durchgeführt. Die DNA wurde für 5 Minuten bei RT mit dem AE-Puffer inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Da die DNA nur unter sauren Bedingungen an die Silikamembran bindet, löst sie sich nun mittels des basischen Tris-Puffers von der Membran ab und verbleibt im AE-Puffer. Die so gewonnene DNA kann dann für die PCR verwendet werden.

4.5.5. Bestimmung der DNA-Konzentration: Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie wurden Konzentration und Reinheitsgrad der isolierten DNA bestimmt. Die Menge der ultravioletten (UV) Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) entspricht ein Absorptionswert einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Hierfür wurde das Gerät zuerst mit einer Lösung aus 95 µl Aqua bidest. und 5 µl AE-Puffer geeicht. Die DNA wurde dann im Verhältnis 1:20 verdünnt (5 µl DNA-Lösung plus 95 µl Aqua bidest.). Die Messungen wurden in einer Quarzglasküvette mit dem Photometer Genequant® der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt.

Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm ($=\lambda_1$), das für Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ($=\lambda_2$). Als Reinheitskriterium wurde der Quotient λ_1/λ_2 herangezogen. Dieser Quotient aus DNA/Protein sollte bei reiner DNA zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Lag der Quotient λ_1/λ_2 im zulässigen Bereich, ließ sich die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnen:

$$\lambda_1 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \text{ µg/ml}$$

Eine DNA-Lösung von 50 µg/ml ergibt bei $\lambda_1 = 260 \text{ nm}$ eine Absorption von 1,0 (Sambook 1989).

Die DNA-Konzentration lag in der Regel bei ca. 100 µg/ml. Anschließend wurden die DNA-Lösungen mit Wasser einheitlich auf eine Konzentration von 50 ng/µl standardisiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.6. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Mitte der 80er Jahre von Kary Mullis (Mullis 1990; Saiki et al. 1985) entwickelten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich geringste Mengen spezifischer DNA nachweisen (Strachan und Read 1996). Heute bietet die PCR eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. die Identifikation von Mutationen, die bei der Vererbung von Krankheiten eine Rolle spielen, oder der genetische Fingerabdruck in der Medizin bzw. der forensischen Psychiatrie.

Das Reaktionsprinzip der PCR ähnelt der Replikation der DNA in der Zelle. Ausgehend von einer DNA-Matrize und einem spezifischen Primerpaar, das an den *sense*- bzw. *antisense*-Strang hybridisiert, wird die von den Primern flankierte Sequenz exponentiell amplifiziert.

Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Bei der Denaturierung (ca. 94°C) wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt (Volkenandt et al. 1990).

Beim Annealing (ca. 55°C) hybridisieren die Oligonukleotid-Primer mit den beiden Matrizensträngen und dienen der DNA-Polymerase bei der Elongation (ca. 70°C) als Startmoleküle. Dieser Zyklus wird je nach Reaktion ca. 25–35 mal wiederholt. Während dieser Kettenreaktion wird das gewünschte DNA-Fragment millionenfach amplifiziert.

Die PCR ist eine relativ empfindliche Methode, weswegen für eine optimale Reaktion bestimmte Bedingungen eingehalten werden müssen. So kann beispielsweise eine zu hohe Konzentration an *Taq*-Polymerase die Bildung von Nebenprodukten verstärken, da die Substratspezifität des Enzyms sinkt. Auch die Primerkonzentrationen müssen entsprechend gewählt werden. Zu hohe Konzentrationen können zur gegenseitigen Hybridisierung der Primer führen, zu niedrige wiederum unterbinden den reibungslosen Ablauf der Reaktion, da zu wenig Oligonukleotide für die nacheinander ablaufenden Zyklen zur Verfügung stehen (Abb. 11).

Um eine optimale Ausbeute und eine stabile Reaktion zu ermöglichen, wurden die Parameter der PCR optimiert.

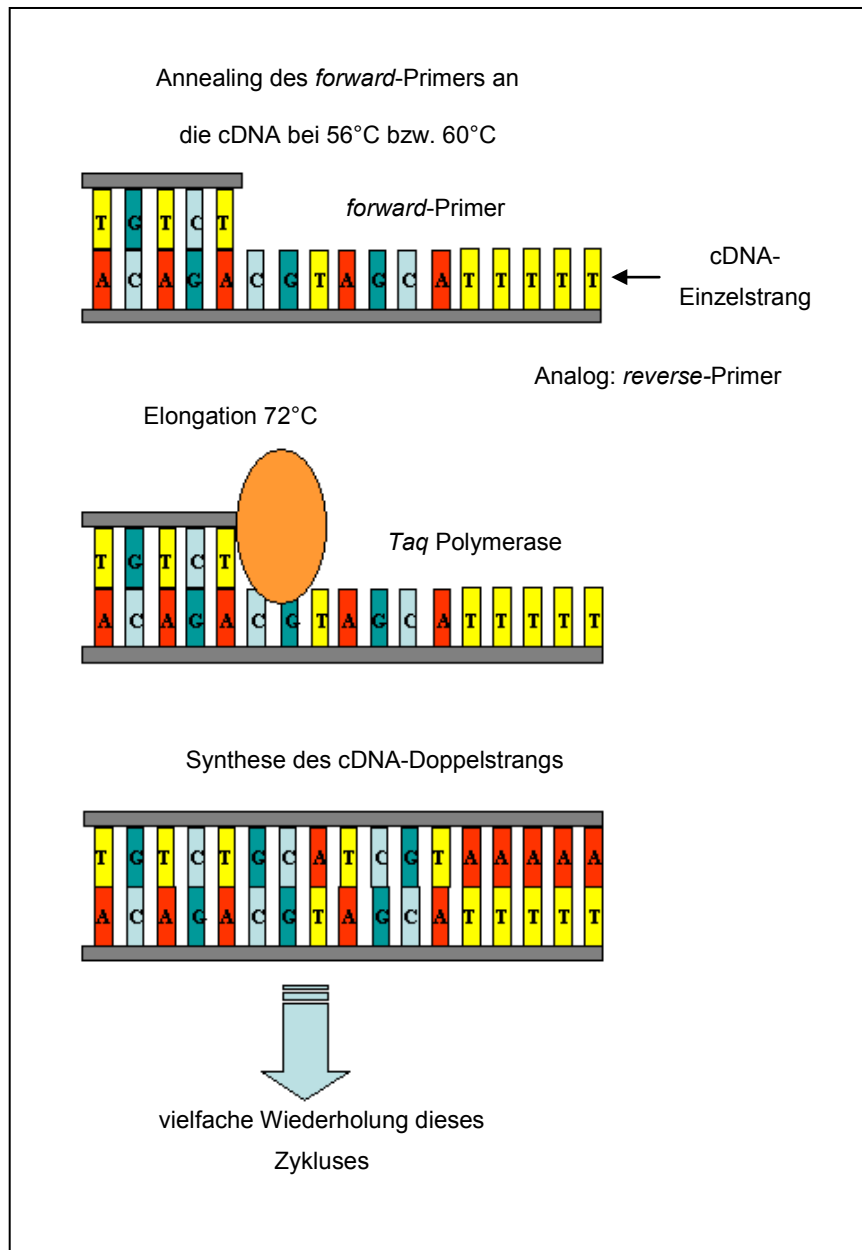


Abb. 11: Schematische Darstellung der Grundschritte der PCR: Annealing, Elongation und Synthese des cDNA-Doppelstranges (Volkenandt et al. 1990).

4.7. Optimierung der Polymerasekettenreaktion

4.7.1. Primerdesign

Das Primerdesign wurde mit dem Programm „Primer3“ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) im Internet vorgenommen. Dieses Programm bestimmt die günstigsten Primerkombinationen für eine bestimmte Sequenz. Hierzu wurde anhand der SNP-Identitätsnummer (GRIN1: rs1126442) die flankierende Sequenz des zu bestimmenden SNPs als Grundlage für das Primerdesign verwendet.

Die von uns gewählten Primer (Tab. 9) besitzen eine Länge von 19–20 Nukleotiden, ihr G/C Gehalt liegt bei 55–63% und die Schmelztemperatur des Primers lag in ähnlichen Bereichen. Um Primer-Dimere zu vermeiden wurden komplementäre Basensequenzen vermieden. In „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurden die Primer und die zu amplifizierenden Sequenzen auf ihre Spezifität überprüft.

Tab. 9: Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	G/C Gehalt	Länge
nm1f4	GTG GGA GTG CTG GAG TCC T	63%	19 bp
nm1r4	GGT CGG TGA TGT TCT CCT TC	55 %	20 bp

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden sie in 1xTE so gelöst, dass die Lösung eine Konzentration von 100 pmol/μl besaß. Aus dieser Stammlösung wurden durch eine 1:10 Verdünnung Primer-Lösungen mit einer Konzentration von 10pmol/μl hergestellt und so im PCR-Ansatz eingesetzt.

4.7.2. Puffer-Optimierung

Die Ermittlung des besten Puffers erfolgte über eine Testreihe mit Puffern unterschiedlicher MgCl_2 -Konzentration und pH-Werte. Die MgCl_2 -Konzentrationen variierten von 7.5 mM bis 17 mM, der pH-Wert von pH 8.5–pH 10.0 (Tab. 10).

Für GRIN1 stellte sich der Puffer M mit einer MgCl_2 -Konzentration von 7.5 mM und dem pH 10.0 als optimale Bedingung heraus.

Tab. 10: Die für die Optimierung der Polymerasekettenreaktion verwendeten Puffer

Puffer	pH-Wert	MgCl_2 -Konzentration	Puffer	pH-Wert	MgCl_2 -Konzentration
A	8.5	7.5 mM	I	9.5	7.5 mM
B	8.5	10 mM	J	9.5	10 mM
C	8.5	12.5 mM	K	9.5	12.5 mM
D	8.5	17.5 mM	L	9.5	17.5 mM
E	9.0	7.5 mM	M	10.0	7.5 mM
F	9.0	10 mM	N	10.0	10 mM
G	9.0	12.5 mM	O	10.0	12.5 mM
H	9.0	17.5 mM	P	10.0	17.5 mM

4.7.3. Annealing-Temperatur

Hohe Annealing-Temperaturen führen zu einer sehr spezifischen Amplifikation während niedrigere Temperaturen die Ausbeute steigern. Die günstigste Annealing-Temperatur wurde mit Hilfe eines über dem Heizblock programmierten Temperaturgradienten ermittelt. Die Temperatur stieg über dem Heizblock konstant von 55.0°C bis auf 61.0°C an. Für die Durchführung der PCR wählten wir für GRIN1 eine konstante Annealing-Temperatur von 56.0 °C.

4.7.4. PCR-Ansatz und -Programm

Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt, es wurden 1 µl genomische DNA, 10 µl Puffer M, 1 µl dNTP, 0.5 µl von jedem Primer und 37 µl H₂O bei pH 10.0 verwendet. Folgende Tabelle zeigt Reihenfolge, Menge und Konzentration, in der die Reagenzien pipettiert wurden (Tab. 11):

Tab. 11: PCR-Ansatz

	Konzentration	Menge
DNA	50 ng/ µl	1 µl
Puffer M	5 x	10 µl
dNTP	10 pmol	1 µl
nm1f4 Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl
nm1r4 Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl
H ₂ O		37.0 µl

Das PCR-Programm wurde folgendermaßen durchgeführt: Zuerst Denaturierung von 5 Minuten bei 94°C, anschließend 35 Zyklen aus Denaturierung von 30 Sekunden bei 94°C, Annealing von 30 Sekunden bei 56°C und Extension von 1 Minute bei 72°C und abschließende Extension von 10 Minuten bei 72°C (Tab. 12).

Tab. 12: PCR-Programm

94 °C	5'	
94°C	30''	} 35 x
56°C	30''	
72°C	1'	
72°C	10'	

4.8. Restriktionsansatz

```

+17,304 GGTGAGTGCT GGCCTTGGC GGGTCCCCG AACGGGGAGG ACCCCACGGG
+17,354 CTCTGAGTCG CATGCTCGCC TAGGCATCCT CGGGCTGCAG CTCATCAACG
+17,404 GCAAGAACGA GTCGGCCAC ATCAGCGACG CCGTGGGCGT GGTGGCCCAG
+17,454 GCCGTGCACG AGCTCCTCGA GAAGGAGAAC ATCACCGACC CGCCGCGGGG
+17,504 CTGCGTGGGC AACACCAACA TCTGGAAGAC CGGGCCGCTC TTCAAGAGGT
+17,554 GGGCGGGGCC TCCCCGGAGC TGGGCGGGGC TGCTCTTGGG GAGGTGGGCG
+17,604 GGGTCACTCC AGAGATGGGC GGGGCCGCTC TTGGGGAGGT GGGCGGGGCC
+17,654 ACTCTCCAGA GCTGGGCGGA GCAGCTCTCA GGA CTAGGCG GGGCCGCTCT
+17,704 TAGGGAGCTG GGGGAGCGCT CCTCAAGAGA TGGGTGGGGG CACTCTCGGG
+17,754 GAGGTGGGCG GGGTCGCTTC CAGGAGGTGG GCGGCGTCGC TCTCAGGGGT
+17,804 ACTGCAGTGG AGCCTGCTGC CAACATCCTC TGGACACTGT TACTTCTTCTC

```

Abb. 12: Amplifizierte Zielsequenz des Exon 7 des GRIN1-Gens: Der untersuchte Basenaustauschpolymorphismus [A/G] an Stelle 17438 ist grau unterlegt. Die fett gedruckten, unterstrichenen Sequenzen zeigen die verwendeten Primer, wobei die Sequenz des *sense*-Primers die Basenfolge **ACGGGCTCTGAGTCGCAT** und die des *antisense*-Primers **GAAGTAACAGTGTCCAGAGGATG** hat.

Da sich der Polymorphismus V285V (rs1126442) als Restriktionlängenpolymorphismus bestimmen lässt, wurde die amplifizierte DNA mit dem Restriktionsenzym Btg I verdaut (Abb. 12).

Btg I schneidet spezifisch an der Schnittstelle der Basenfolge 3'-CCr_yGG-5' (r = Purine und y = Pyrimidine). Findet sich an Position 17438 ein Guanin erkennt das Enzym die Schnittstelle und das DNA-Fragment wird gespalten. Es resultieren drei DNA-Fragmente der Länge 212 bp, 87 bp und 37 bp. Befindet sich an Position 17438 ein Adenin, gibt es keine adäquate Schnittstelle für Btg I und es entstehen zwei DNA-Fragmente der Länge 212 bp und 144 bp (Abb. 13).

Anhand des direkt ablesbaren Bandenmusters kann rückgeschlossen werden, ob die untersuchte Person die Restriktionserkennungssequenz aufweist oder nicht.

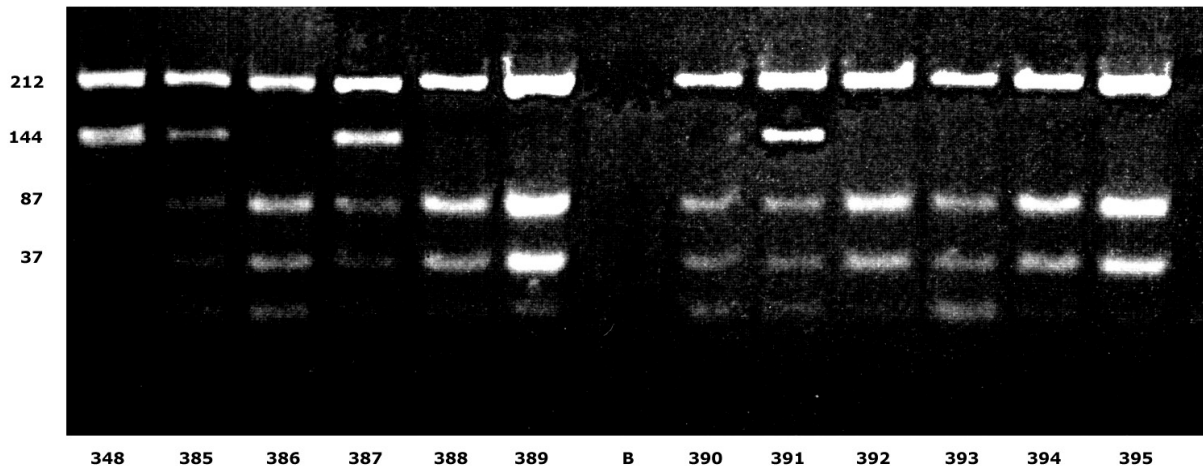


Abb. 13: Auf Agarosegel dargestellter 17438 [A/G] Polymorphismus nach Btg I-Verdau: Die Bande des Allel G ist nach Verdau durch das Enzym bei 87 bp und 37 bp sichtbar, die Bande bei 144 bp stellt das Allel A dar.

4.9. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde eine 2 %ige Agarose-Lösung mit 0,5 x TBE-Puffer hergestellt und in der Mikrowelle auf Schmelztemperatur gebracht. Nach Zugabe von 2 µl /100 ml Ethidiumbromid-Lösung wurde das Gel in die Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid ist eine farbige Verbindung, die in die DNA-Helix interkaliert und bei Beleuchtung mit UV-Licht fluoresziert. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Den einzelnen Proben wurde 5 µl Loading Dye zugegeben. Loading Dye enthält Glycerin, das die Dichte der PCR-Probe erhöht und dadurch die DNA in die Geltaschen sinken lässt. 20 µl bzw. 50 µl des PCR-Produkts wurde in die Taschen geladen. Zur Identifizierung der Produktlängen wird auf das Gel zusätzlich ein DNA-Marker mit Fragmenten definierter Länge aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 V Gleichspannung für eine Zeit von 45 Minuten.

Die auf das Gel aufgetragene, negativ geladene DNA wandert von der negativen auf die positive Elektrode zu. Sie wird dabei von dem vernetzten Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt.

Die Ablichtung der Gele wurde mit dem so genannten „Eagle Eye“-Gerät der Firma Stratagene durchgeführt. Mit diesem Gerät ist es möglich, das Gel mit UV-Licht zu bestrahlen und zu fotografieren.

Tab. 13: Die für die Durchführung der Gelelektrophorese verwendeten Reagenzien und deren Zusammensetzung

Reagenzien	Zusammensetzung
Agarose	gebrauchsfertiges Pulver
Ethidiumbromid	2 µl /100 ml
0,5 x TBE-Puffer	5,4 % Trisbase (Roth) 2,75 % Borsäure (Roth) 0,375 % Na ₂ EDTA (Roth)
6 x Loading Dye	1,5 ml Bromphenolblau 3,0 ml 30 % ige Glycerol- Lösung 100 µl 0,5 M EDTA- Lösung 5,4 ml H ₂ O
DNA-Leiter	100 µl Gene-Ruler Stammlösung (0,5 mg DNA/ml) 166 µl 6 x Loading Dye 734 µl H ₂ O

4.10. Statistische Auswertung

Die Statistik wurde mit Hilfe der SPSS 14.0 Software durchgeführt. Die Verteilung der Genotypen wurde bezüglich des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet. Unterschiede in den Häufigkeiten der Allele, Genotypen und Haplotypen bei den Probanden wurden mittels des zweiseitigen χ^2 -Tests verglichen. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ festgelegt, während $p < 0.1$ als Trend gewertet wurde.

5. Ergebnisse

Zur Identifizierung von Assoziationen des GRIN1-Gen mit Kognition wurden der Intelligenztest HAWIE-R sowie eine Genotypisierung des Polymorphismus V285V (rs1126442) durchgeführt. In die Assoziationsstudie wurden 294 neuropsychiatrisch gesunde Probanden eingeschlossen, davon 132 Männer und 162 Frauen. Weiterhin wurden Alter und Schulbildung (Hauptschule, Realschule bzw. Abitur) für die Auswertung berücksichtigt.

5.1. SNP V285V (rs1126442)

Der in dieser Studie untersuchte Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) ist in Exon 7 des GRIN1-Gens lokalisiert. Er führt zum Ersetzen von Guanin (G) zu Adenin (A) an Position 17438, bewirkt allerdings keinen Austausch der Aminosäure Valin (Abb. 14).



Abb. 14: Der Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) ist in Exon 7 des GRIN1-Gens lokalisiert. Er führt zum Ersetzen von Guanin (G) zu Adenin (A) an Position 17438, beeinflusst aber die Aminosäuresequenz nicht (V285V).

Die Genotypverteilung des Polymorphismus V285V (rs1126442) zeigt ein Auftreten des AA-Genotypen von 8,8 % im Vergleich zu den Genotypen GA von 47,3 % und

GG von 43,9 % (Tab. 14). Die Verteilung der Genotypen dieser Stichprobe liegt damit innerhalb des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ($F=0,078$; $df=1$; $p=0,18$).

Tab. 14: Darstellung der Genotyp- und Allelverteilung des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442)

	GG	GA	AA	Allel G	Allel A
N [Anzahl]	129	139	26	397	191
N [%]	43,9	47,3	8,8	67,5	32,5

5.2. Analyse der Allelfrequenz des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) im Vergleich zu den HAWIE-R-Untertests

Bei der Datenanalyse des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) wurde zunächst die Verteilung der Allele innerhalb der Kontrollgruppe untersucht.

Dabei ist weder bei Gesamt-IQ ($F=0,614$; $df=1/583$; $p=0,434$) noch bei Verbal-IQ ($F=0,282$; $df=1/583$; $p=0,596$) und Handlungs-IQ ($F=0,541$; $df=1/583$; $p=0,462$) eine signifikante Assoziation zu erkennen (Abb. 15). Auch die Ergebnisse der verschiedenen Untertests zeigten keine Signifikanz (Tab. 15).

Ergebnisse

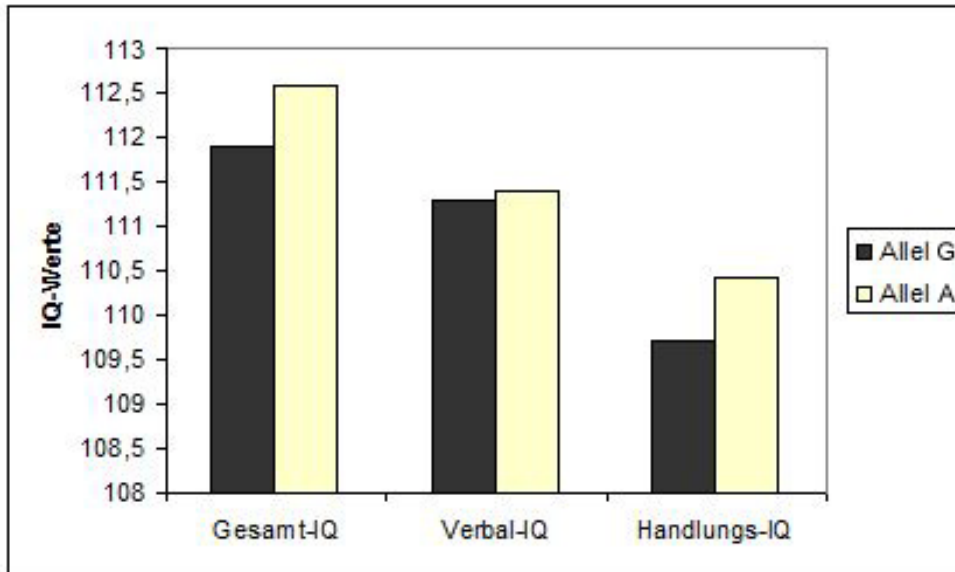


Abb. 15: Verteilung der Allele: Weder bei Gesamt-IQ ($F=0,614$; $df=1/583$; $p=0,434$) noch bei Verbal-IQ ($F=0,282$; $df= 1/583$; $p=0,596$) und Handlungs-IQ ($F=0,541$; $df=1/583$; $p=0,462$) ist eine signifikante Assoziation erkennbar.

Ergebnisse

Tab. 15: Darstellung der Allelverteilung des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442)

	Allele		F	P
	N =397	N = 191		
	Allel G	Allel A		
	MW (SD)	MW (SD)		
Gesamt-IQ	111,9 (14,7)	112,6 (15,1)	0,614	0,434
Verbal-IQ	111,3 (13,2)	111,4 (13,9)	0,282	0,596
Allgemeines Wissen	16,6 (3,9)	16,8 (3,9)	0,850	0,357
Zahlennachsprechen	13,8 (3,6)	13,5 (3,6)	1,341	0,247
Wortschatz-Test	22,8 (4,9)	23,1 (5,1)	1,424	0,233
Rechnerisches Denken	13,9 (3,1)	13,9 (3,3)	0,129	0,719
Allgemeines Verständnis	21,9 (2,9)	22,1 (3,1)	0,859	0,354
Gemeinsamkeitenfinden	26,7 (3,6)	26,4 (3,9)	0,406	0,524
Handlungs-IQ	109,7 (14,5)	110,4 (15,2)	0,541	0,462
Bilderergänzen	13,1 (2,9)	13,3 (2,8)	0,974	0,324
Bilderordnen	27,6 (11,4)	28,6 (11,4)	2,125	0,145
Mosaik-Test	32,1 (9,5)	31,8 (9,5)	0,116	0,734
Figurenlegen	30,0 (6,2)	30,6 (5,5)	1,745	0,187
Zahlen-Symbol-Test	54,3 (12,6)	53,7 (13,3)	1,253	0,263
df=1/582. df=1/583				

5.3. Analyse der Daten der Genotypen des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) im Vergleich zu den HAWIE-R-Untertests

Anschließend wurden die Daten der Genotypen des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) innerhalb der Kontrollgruppe untersucht. Dabei konnte bei den drei Genotypen bezüglich Gesamt-IQ ($F=0,935$; $df=2/287$; $p=0,394$), Verbal-IQ ($F=0,583$; $df=2/287$; $p=0,559$) und Handlungs-IQ ($F=0,468$; $df=2/287$; $p=0,632$) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 16). Auch die Verteilung der Genotypen auf die verschiedenen HAWIE-R-Untertests zeigte keine signifikante Assoziation (Tab. 16).

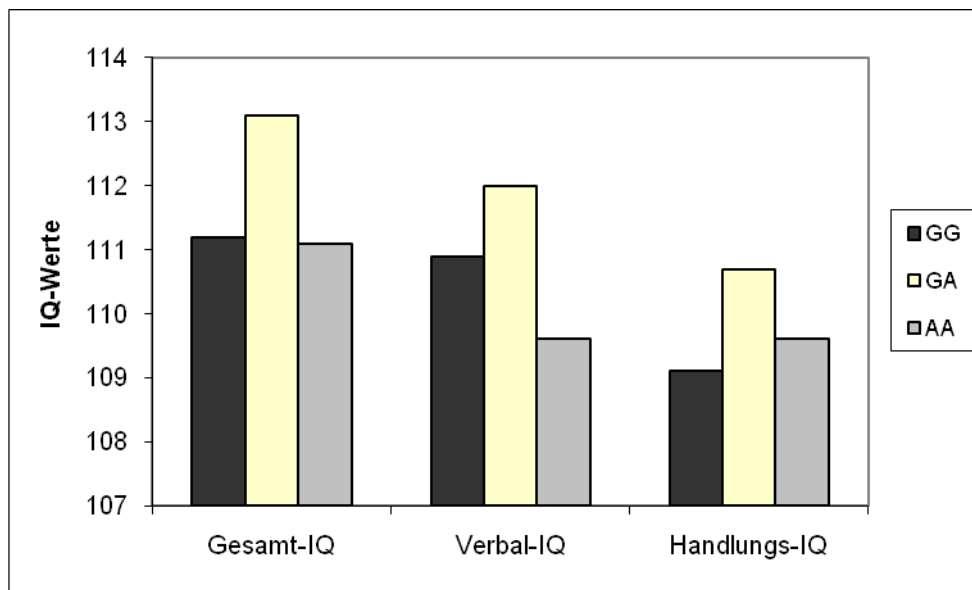


Abb. 16: Verteilung der Genotypen: Weder bei Gesamt-IQ ($F=0,935$; $df=2/287$; $p=0,394$) noch bei Verbal-IQ ($F=0,583$; $df=2/287$; $p=0,559$) und Handlungs-IQ ($F=0,468$; $df=2/287$; $p=0,632$) ist eine signifikante Assoziation erkennbar.

Ergebnisse

Tab. 16: Darstellung der Genotyp-Verteilung des GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442)

	Genotypen			F	P
	N = 129	N = 139	N = 26		
	GG	GA	AA		
	MW (SD)	MW (SD)	MW (SD)		
Gesamt-IQ	111,2 (14,3)	113,1 (15,4)	111,1 (14,3)	0,935	0,394
Verbal-IQ	110,9 (12,8)	112,0 (14,0)	109,6 (13,7)	0,583	0,559
Allgemeines Wissen	16,6 (3,7)	16,8 (4,2)	16,7 (3,1)	0,487	0,615
Zahlennachsprechen	13,9 (3,6)	13,8 (3,6)	12,9 (3,6)	1,052	0,351
Wortschatz-Test	22,5 (4,8)	23,4 (5,1)	22,3 (5,1)	1,902	0,151
Rechnerisches Denken	13,8 (3,1)	14,0 (3,2)	13,7 (3,4)	0,184	0,832
Allgemeines Verständnis	21,8 (2,7)	22,0 (3,2)	22,4 (2,7)	0,417	0,659
Gemeinsamkeitenfinden	26,7 (3,3)	26,6 (4,0)	25,9 (3,6)	0,364	0,695
Handlungs-IQ	109,1 (14,2)	110,7 (15,1)	109,6 (15,6)	0,460	0,632
Bilderergänzen	12,9 (2,9)	13,5 (2,9)	12,9 (2,7)	1,044	0,353
Bilderordnen	27,0 (11,4)	28,8 (11,5)	28,3 (11,2)	0,132	0,324
Mosaik-Test	32,0 (9,5)	32,4 (9,7)	30,4 (8,9)	0,220	0,803
Figurenlegen	29,9 (6,4)	30,2 (5,9)	31,6 (4,4)	1,532	0,218
Zahlen-Symbol-Test	54,2 (12,1)	54,4 (13,4)	51,6 (13,1)	0,543	0,582
df=2/286. df=2/287					

5.3.1. Analyse der A-Allel-Träger

Desweiteren wurden die Träger des A-Allels (GA, AA) in eine Gruppe zusammengefasst und mit den homozygoten G-Trägern (GG) verglichen.

Der Gesamt-IQ ($F=1,463$; $df=1/289$; $p=0,227$) lässt keine Signifikanz erkennen, ebenso sind Verbal-IQ ($F=0,796$; $df=1/289$; $p=0,373$) und Handlungs-IQ ($F=0,873$; $df=1/289$; $p=0,351$) unauffällig (Abb. 17).

Allerdings zeigt sich im Unterpunkt ‚Wortschatz-Test‘ ein Trend ($F=3,111$; $df=1/288$; $p=0,079$), wobei die A-Allel-Träger bessere Werte erzielen (Tab. 17).

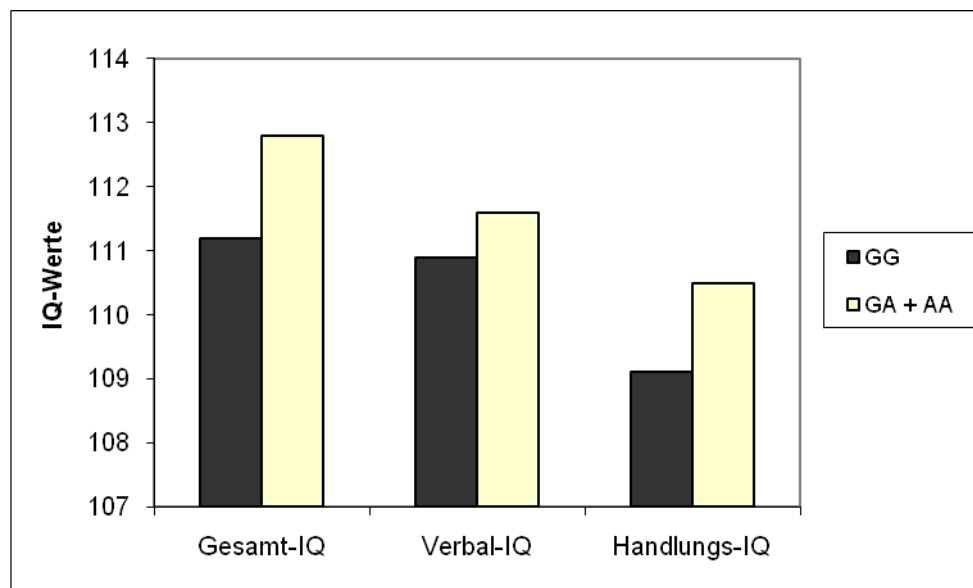


Abb. 17: Verteilung der homozygoten G-Träger im Vergleich zu den Allelträgern für A: Weder bei Gesamt-IQ ($F=1,463$; $df=1/289$; $p=0,227$) noch bei Verbal-IQ ($F=0,796$; $df=1/289$; $p=0,373$) und Handlungs-IQ ($F=0,873$; $df=1/289$; $p=0,351$) ist eine signifikante Assoziation erkennbar.

Ergebnisse

Tab. 17: Darstellung der Häufigkeit der A-Träger (AA, GA) im Vergleich zu den homozygoten G-Trägern (GG). Der Trend im ‚Wortschatz-Test‘ ist grau unterlegt.

	Genotypen		F	P
	N =129	N = 165		
	GG	GA + AA		
	MW (SD)	MW (SD)		
Gesamt-IQ	111,2 (14,2)	112,8 (15,2)	1,463	0,227
Verbal-IQ	110,9 (12,8)	111,6 (13,9)	0,796	0,373
Allgemeines Wissen	16,6 (3,7)	16,8 (4,0)	0,929	0,336
Zahlennachsprechen	13,9 (3,6)	13,6 (3,6)	0,611	0,435
Wortschatz-Test	22,5 (4,8)	23,2 (5,1)	3,111	0,079
Rechnerisches Denken	13,8 (3,1)	14,0 (3,3)	0,277	0,599
Allgemeines Verständnis	21,8 (2,7)	22,0 (3,1)	0,470	0,494
Gemeinsamkeitenfinden	26,7 (3,3)	26,5 (3,9)	0,164	0,685
Handlungs-IQ	109,1 (14,2)	110,5 (15,1)	0,873	0,351
Bilderergänzen	12,9 (2,9)	13,4 (2,9)	1,866	0,173
Bilderordnen	27,0 (11,4)	28,7 (11,4)	2,082	0,150
Mosaik-Test	32,0 (9,5)	32,0 (9,6)	0,013	0,908
Figurenlegen	29,9 (6,4)	30,5 (5,7)	0,542	0,462
Zahlen-Symbol-Test	54,2 (12,1)	54,0 (13,4)	0,802	0,371
df=1/288. df=1/289				

5.3.2. Analyse der der G-Allel-Träger

Entsprechend wurden im Anschluss die Träger des G-Allels (GA, GG) zusammengefasst und mit den homozygoten A-Trägern (AA) verglichen.

Dabei zeigen Gesamt-IQ ($F=0,053$; $df=1/289$; $p=0,818$), Verbal-IQ ($F=0,104$; $df=1/289$; $p=0,748$) und Handlungs-IQ ($F=0,018$; $df=1/289$; $p=0,892$) keinen signifikanten Effekt (Abb. 18).

Im Unterpunkt ‚Figurenlegen‘ zeigt sich allerdings ein Trend ($F=3,022$; $df=1/288$; $p=0,083$), wobei die G-Träger schlechtere Werte erzielen (Tab. 18).

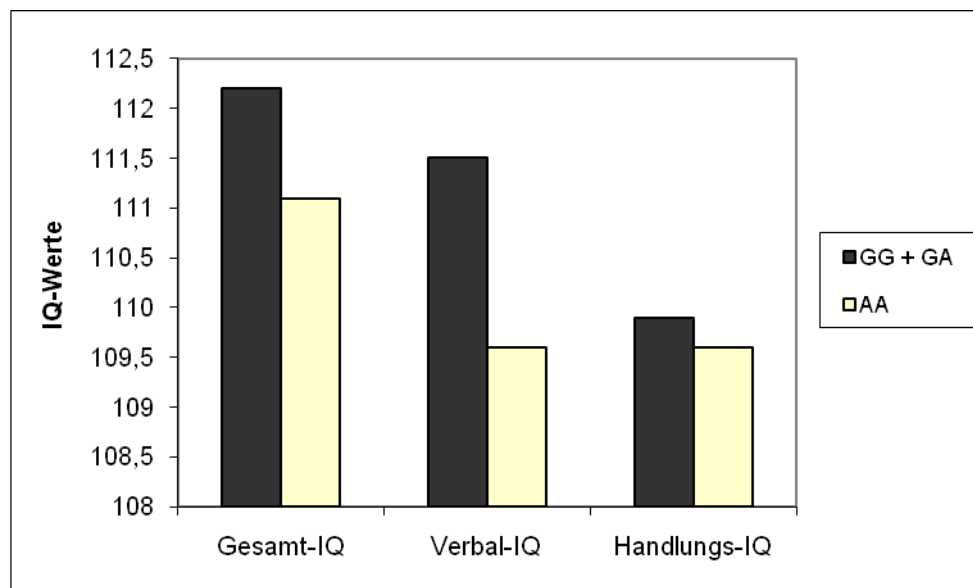


Abb. 18: Verteilung der homozygoten A-Träger im Vergleich zu den Allelträgern für G: Weder bei Gesamt-IQ ($F=0,053$; $df=1/289$; $p=0,818$) noch bei Verbal-IQ ($F=0,104$; $df=1/289$; $p=0,748$) und Handlungs-IQ ($F=0,018$; $df=1/289$; $p=0,892$) ist eine signifikante Assoziation erkennbar.

Ergebnisse

Tab. 18: Darstellung der Häufigkeit der G-Träger (GG, GA) im Vergleich zu den homozygoten A-Trägern (AA). Der Trend im Test ‚Figurenlegen‘ ist grau unterlegt.

	Genotypen		F	P
	N =268	N = 26		
	GG + GA	AA		
	MW (SD)	MW (SD)		
Gesamt-IQ	112,2 (14,9)	111,1 (14,3)	0,053	0,818
Verbal-IQ	111,5 (13,4)	109,6 (13,7)	0,104	0,748
Allgemeines Wissen	16,7 (4,0)	16,7 (3,1)	0,208	0,649
Zahlennachsprechen	13,8 (3,6)	12,9 (3,6)	1,926	0,166
Wortschatz-Test	22,9 (4,9)	22,2 (5,1)	0,030	0,863
Rechnerisches Denken	13,9 (3,2)	13,7 (3,4)	0,021	0,885
Allgemeines Verständnis	21,9 (3,0)	22,4 (2,7)	0,652	0,420
Gemeinsamkeitenfinden	26,6 (3,7)	25,9 (3,6)	0,684	0,409
Handlungs-IQ	109,9 (14,7)	109,6 (15,6)	0,018	0,892
Bilderergänzen	13,2 (2,9)	12,9 (2,7)	0,008	0,928
Bilderordnen	27,9 (11,5)	28,3 (11,2)	0,707	0,401
Mosaik-Test	32,2 (9,6)	30,4 (8,9)	0,441	0,507
Figurenlegen	30,1 (6,1)	31,6 (4,4)	3,022	0,083
Zahlen-Symbol-Test	54,3 (12,8)	51,6 (13,1)	0,693	0,406
df=1/288. df=1/289				

6. Diskussion

6.1. Interpretation der Ergebnisse

Zahlreiche Studien haben den pharmakologischen und genetischen Beweis erbracht, dass der NMDA-Rezeptor mit kognitiver Leistung in Verbindung steht. Die These, dass ein Zusammenhang zwischen der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und kognitiven Fähigkeiten besteht, unterliegt vornehmlich tierexperimentellen und pharmakologischen Studien (Shimizu et al. 2000). Jedoch existiert bisher kein eindeutiger molekulargenetischer Beweis, dass Polymorphismen des GRIN1-Gens mit kognitiven Fähigkeiten in Beziehung stehen. So konnte auch in der vorliegenden Arbeit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen GRIN 1 und Kognition belegt werden.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass keine signifikanten Assoziationen zwischen dem hier untersuchten Marker, dem stillen Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) auf Exon 7 des GRIN1-Gens, mit kognitiven Fähigkeiten, gemessen mittels HAWIE-R, gefunden wurden. Die Untersuchung der Allelfrequenz zeigte weder bei Gesamt-, Handlungs- oder Verbal-IQ noch bei den verschiedenen Untertests signifikante Assoziationen. Auch die Analyse des Genotyps ergab keinen Haupteffekt bezüglich Gesamt-, Handlungs- oder Verbal-IQ. Bei der Gegenüberstellung der GG-Homozygoten mit den A-Trägern (GA + AA) zeigte sich im „Wortschatztest“ ein Trend, wobei die A-Träger bessere Werte erzielten. Bei dem Vergleich der AA-Homozygoten mit den G-Trägern (AG + GG) wurde ein Trend im Untertest „Figurenlegen“ festgestellt, in welchem AA-Homozygote besser abschnitten.

Der GRIN1-Polymorphismus V285V (rs1126442) bewirkt durch das Ersetzen von Guanin (G) durch Adenin (A) keinen Austausch der Aminosäure Valin (Rice et al. 2001). Aufgrund dieser stillen Veränderung gehört er nicht zu den funktionellen Polymorphismen und hat wahrscheinlich keinen physiologischen Effekt auf zellulärer Ebene. Ob dieser nichtfunktionelle SNP Einfluss auf Gehirnfunktionen hat, ist unklar.

Es ist dennoch denkbar, dass diese polymorphe Stelle in einem kausalen Zusammenhang mit kognitiver Leistungsfähigkeit steht.

Im Hinblick auf die Untersuchungsergebnisse lassen sich verschiedene Thesen aufstellen. Zum einen ist es denkbar, dass der hier untersuchte Polymorphismus tatsächlich keinen Einfluss auf kognitive Fähigkeiten besitzt und es sich bei den gefundenen Trends um Artefakte bzw. zufällige Zusammenhänge handelt, die man als falsch positive Ergebnisse auffassen muss. Eine andere Möglichkeit ist, dass eine Beziehung zwischen dem Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) und bestimmten kognitiven Teilfähigkeiten, wie Figurenlegen und Wortschatzfertigkeiten, nicht aber zur allgemeinen Intelligenz besteht. Weiterhin könnte man annehmen, dass eine indirekte Beziehung zwischen dem hier untersuchten GRIN1-Polymorphismus und kognitiven Fähigkeiten vorliegt, welche über mindestens ein anderes, hier nicht untersuchtes Allel vermittelt wird („linkage disequilibrium“).

Bisher existieren keine veröffentlichten Untersuchungen zu GRIN1 und Kognition bei gesunden Menschen, sondern vor allem Studien, die sich mit der Assoziation von GRIN1 und psychiatrischen Erkrankungen befassen. Da vor allem bei Schizophrenie (Randolph et al. 1993; Mohamed et al. 1999; Cirillo und Seidman 2003; Skelley et al. 2008; Perry et al. 2000; Huguelet et al. 2002), aber auch bei bipolaren Störungen (Manove und Levy 2010) und Alkoholabhängigkeit, regelmäßig kognitive Leistungen beeinträchtigt sind, kann angenommen werden, dass die für die Krankheiten verantwortlichen Gene auch bei Gesunden einen Einfluss auf Kognition und Intelligenz haben (Aylward et al. 1984). Mangels Vergleichsstudien zu GRIN1 und gesunden Menschen werden hier also die Ergebnisse mit Untersuchungen zu GRIN1 und psychiatrischen Erkrankungen verglichen.

Keine Assoziationen zwischen GRIN1 und Schizophrenie sowie bipolaren Störungen konnten durch die Referenzstudien von Paus et al. 2004, Williams et al. 2002, Martucci et al. 2003, Rice et al. 2001 und Sakurai et al. 2000 sowie Georgi et al. 2006 belegt werden.

Paus et al. führten ein systematisches Screening des GRIN1-Gens durch, um DNA-Sequenzveränderungen zu identifizieren. Mit der Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) konnten vier Basenaustauschpolymorphismen nachgewiesen werden,

wovon zwei synonym kodierende Basenaustauschpolymorphismen (cSNPs) und zwei exon-flanking Intronsequenzen waren. Der Vergleich der Allelfrequenzen und der Genotypenverteilung des SNP V285V (rs1126442) sowie der anderen Marker ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe (Paus et al. 2004). Die Ergebnisse bestätigen die Resultate dieser Studie.

Williams et al. analysierten neben dem SNP V285V (rs1126442) die GRIN1-Polymorphismen 243>C, IVS2-22A>G, P263P und IVS11+8A>G und führten eine Fall-Kontroll-Studie in der kaukasischen Bevölkerung Großbritanniens durch. Bei keinem der untersuchten Einzelmarker konnten Assoziationen mit Schizophrenie gefunden werden, auch nicht bei dem in dieser Arbeit untersuchten SNP V285V (rs1126442), was ebenfalls die Ergebnisse der vorliegenden Studie bekräftigt (Williams et al. 2002).

Auch durch die Studie von Martucci und Kollegen konnte keine Assoziation mit den Einzelmarkern des GRIN1-Gens, so auch nicht mit dem SNP V285V (rs1126442), und Schizophrenie belegt werden. Ihre Studie wurde an 86 Familien-Trios sowie an 91 Kontrollpersonen und 91 Schizophrenie-Patienten durchgeführt, welche alle Kanadier überwiegend kaukasischer Herkunft waren. Aufgrund des unterschiedlichen Studienaufbaus kann diese Studie nur bedingt mit der vorliegenden Arbeit verglichen werden, bestätigt aber dennoch die vorhandenen Ergebnisse (Martucci et al. 2003).

Rice et al. führten ein systematisches Screening des GRIN1-Gens an Schizophrenie-Patienten verschiedener ethnischer Herkunft durch. Es konnten insgesamt 28 Sequenzveränderungen identifiziert werden, wovon 8 in der 5'UTR, 6 in codierenden Regionen und 11 in intronischen Sequenzen lokalisiert waren. Die übrigen Mutationen waren intronische Deletionen und eine Mikroinsertion/Deletion. In den vom alternativen Splicen betroffenen Exons 5, 21 und 22 konnten keine polymorphen Stellen festgestellt werden. Die Frequenz der Polymorphismen unterschied sich signifikant zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen. Das SNP V285V (rs1126442) konnte bei Patienten asiatischer Herkunft nicht nachgewiesen werden. Es wurde keine Fall-Kontroll-Studie mit den gefundenen Polymorphismen durchgeführt (Rice et al. 2001).

Sakurai et al. führten ein Mutationsscreening an 48 japanischen Schizophrenie-Patienten mittels Einzelstrang-Konformationsanalyse durch und konnten die

Varianten IVS2-22T>C, IVS2-12G>A, IVS4-34C>T und 1719G/A (Pro516Pro) identifizierten. Der Polymorphismus V285V (rs1126442) wird in dieser Studie allerdings nicht untersucht. Auch hier konnte für keinen der vier identifizierten Einzelmarker eine Assoziation mit der Erkrankung nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt (Sakurai et al. 2000).

Georgi et al. führten eine Assoziationsstudie zu GRIN1 und bipolaren Störungen durch, wobei sie 306 Patienten und 319 Kontrollpersonen deutscher Herkunft untersuchten. Auch sie konnten keine Signifikanz feststellen, was ebenfalls die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt (Georgi et al. 2006).

Signifikante Assoziationen mit GRIN1 und psychiatrischen Erkrankungen konnten bisher in den Untersuchungen von Zhao et al. 2006, Qin et al. 2005, Begni et al. 2003, Georgi et al. 2007, Galehdari et al. 2009 und Mundo et al. 2003 festgestellt werden, allerdings nie mit dem hier untersuchten Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442). Ein Vergleich der Studien mit der vorliegenden Arbeit fällt aufgrund der unterschiedlichen Studiendesigns oft schwer.

Zhao et al. konnten in einer Fall-Kontroll-Studie für vier Einzelmarker des GRIN1-Gens Assoziationen mit Schizophrenie finden. Die signifikanteste Assoziation zeigte dabei der SNP rs11146020, welcher auch in der familienbasierten Studie Signifikanz zeigte. Als Probanden dienten 2455 Han-Chinesen, an denen eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt wurde. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte SNP V285V (rs1126442) wurde von Zhao et al. nicht identifiziert (Zhao et al. 2006).

Qin et al. verwendeten Einzelmarker, die bereits publiziert waren und untersuchten diese an 140 Kontrollpersonen und 253 Schizophrenie-Patienten, klassifiziert mittels DSM-IV. Es wurden 11 Einzelmarker des GRIN1-Gens untersucht, wobei der in dieser vorliegenden Arbeit erforschte SNP V285V (rs1126442) in dieser Population nicht signifikant vorhanden war. Es konnte eine signifikante Interaktion zwischen dem SNP G1001C des GRIN1-Gens und den Polymorphismen T4197C und T5988C des GRIN2B-Gens bei Schizophrenie-Patienten festgestellt werden (Qin et al. 2005).

Der Basenaustauschpolymorphismus G1001C (rs11146020) wurde ebenfalls von Begni et al. analysiert. Hierbei wurden 139 italienische Schizophrenie-erkrankte mit 145 gesunden Probanden verglichen. Signifikante Assoziationen konnten sowohl bei den

Allel-Frequenzen als auch bei der Genotyp-Verteilung gefunden werden. Der in dieser Arbeit analysierte SNP V285V (rs1126442) wurde nicht untersucht (Begni et al. 2003).

Auch Galehdari et al. konnten eine signifikante Assoziation zwischen dem G1001C Polymorphismus (rs11146020) und Schizophrenie finden. Sie führten eine Kohortenstudie im Iran an Probanden gemischter Ethnizität durch, an der 200 nicht-verwandte Patienten und 200 Kontrollpersonen teilnahmen. Der in der vorliegenden Studie untersuchte SNP V285V (rs1126442) wurde nicht analysiert (Galehdari et al. 2009).

Der Basenaustauschpolymorphismus rs11146020 zeigt auch in der Studie von Georgi et al. Signifikanz für Schizophrenie, ebenso wie die Polymorphismen rs4880213, rs6293 und rs10747050. Die deutlichste Signifikanz wurde hier bei Patienten mit affektiver Psychose festgestellt. Untersucht wurden 354 Patienten und 323 Kontrollpersonen deutscher Herkunft. Auch hier wird der in der vorliegenden Arbeit untersuchte SNP rs1126442 nicht behandelt (Georgi et al. 2007).

Mundo und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie Assoziationen der Polymorphismen 1001-G/C, 1970-A/G und 6608-G/C des GRIN1-Gens mit bipolaren Erkrankungen feststellen. Die stärkste Assoziation konnte hier bei den Haplotypen 1001G-1970A-6608A und 1001G-1970A-6608G bestimmt werden. Ein Zusammenhang mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymorphismus SNP V285V (rs1126442) wird nicht behandelt (Mundo et al. 2003). Auch aufgrund des sehr ungleichen Studienaufbaus, insbesondere der unterschiedliche Ethnizität der Studienteilnehmer und des abweichenden Studiendesigns, ist ein Vergleich mit der vorliegenden Studie schwierig.

Rujescu und Kollegen analysierten in zwei unabhängigen Fall-Kontroll-Studien das GRIN1-Gen in Zusammenhang mit Alkoholabhängigkeit. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Allel-Frequenzen und Genotyp-Verteilung festgestellt werden. Allerdings konnte ein Zusammenhang des SNP 2108A mit durch Entzug verursachten Krampfanfällen entdeckt werden. Ein Einfluss des in dieser Arbeit behandelten Polymorphismus SNP V285V (rs1126442) scheint allerdings nicht zu bestehen. Weiterhin ist bisher der kausale Zusammenhang von durch Alkoholentzug verursachten Krampfanfällen und kognitiven Fähigkeiten unklar (Rujescu et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bisher keine Untersuchung existiert, in der eine signifikante Assoziation zwischen dem GRIN1-Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) und einer psychiatrischen Erkrankung respektive kognitiver Leistungsfähigkeit hergestellt werden konnte.

Die Genotypverteilung des Basenaustauschpolymorphismus V285V (rs1126442) zeigt in dieser Studie ein Auftreten des Genotyp GG von 43,9 %, des Genotyp GA von 47,3 % und des Genotyp AA von 8,8 %. Das G-Allel liegt mit 67,5 % und das A-Allel mit 32,5 % vor.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie lag auch bei den von Rice et al. 2001 untersuchten schizophrenen Patienten das G-Allel signifikant häufiger als das A-Allel vor. Das seltenere Allel wurde bei Kaukasiern mit 24,6 %, bei amerikanischen Ureinwohnern mit 20% und bei Afrikanern mit 6,7% bestimmt. Bei Asiaten konnte der Polymorphismus nicht nachgewiesen werden (Rice et al. 2001). Williams et al. erfassten das A-Allel bei den Einwohnern Großbritanniens und Irlands mit 32%, was das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt (Williams et al. 2002). Paus et al. kommen hingegen zu dem Ergebnis, dass in der allgemeinen deutschen Bevölkerung das A-Allel häufiger vorliegt (Paus et al. 2004). Die exakten Zahlen sind jedoch nicht bei allen Studienveröffentlichungen ersichtlich.

6.2. Diskussion von methodischen Fehlerquellen

Ziel der Molekulargenetik ist es, genetische Ursachen für Mechanismen, in diesem Fall für kognitive Fähigkeiten, auf Ebene der DNA-Sequenz zu identifizieren. Das wird dadurch erschwert, dass an der Ausprägung der Kognition sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren beteiligt sind. Zusätzlich ist Kognition polygen bedingt, also nicht durch ein einzelnes Gen determiniert. Ein tieferes Verständnis kann daher erst nach Identifizierung dieser Gene und der Kenntnis ihrer Wirkungen und Wechselwirkungen entstehen. Assoziationsuntersuchungen sind eine geeignete Methode, um kleine Geneffekte aufzudecken. Da die Ätiologie der Kognition

wahrscheinlich auf einer Beteiligung mehrerer Gene mit teilweise kleinen Effekten beruht, haben Assoziationsuntersuchungen für diese Untersuchung große Vorteile und sind daher für die Analyse der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors geeignet. Die aufgeführten Referenzstudien wurden, wie auch die vorliegende Arbeit, als Assoziationsstudien durchgeführt.

Für die statistische Aussagekraft von Studien ist die Stichprobengröße von Bedeutung. Die aufgeführten Referenzstudien unterscheiden sich stark bezüglich der Anzahl der Probanden, die zwischen 46 Teilnehmern (Paus et al. 2004) und 707 Teilnehmern (Zhao et al. 2006) variiert. Wenn Marker analysiert werden, die in der Bevölkerung entweder sehr häufig oder sehr selten vorliegen, ist eine ausreichend große Probandenanzahl besonders bedeutsam. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Basenaustauschpolymorphismus SNP V285V (rs1126442) lag das G-Allel bei 67,5% der Studienteilnehmer vor. Die Anzahl von 294 Probanden sollte ausreichend sein, um etwaige Assoziationen mit kognitiven Fähigkeiten aufzuzeigen.

Eine zu geringe Probandenanzahl von 46 (Paus et al. 2004), 91 (Martucci et al. 2003), 96 (Sakurai et al. 2000) oder 139 Patienten (Begni et al. 2003) könnte theoretisch zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Ausreichend groß erscheinen die Teilnehmerzahlen von Williams et al. mit 184 (Williams et al. 2002), Galehdari et al. mit 200 (Galehdari et al. 2009), Georgi et al. mit 354 (Georgi et al. 2007) sowie Qin et al. mit 253 Schizophrenie-Patienten (Qin et al. 2005). Mundo et al. untersuchten 288 (Mundo et al. 2003) und Georgi et al. 306 (Georgi et al. 2006) Patienten mit bipolaren Störungen. Die Patientengruppe von Rujescu et al. bestand aus 442 Alkoholabhängigen (Rujescu et al. 2005).

Weiterhin sind Rekrutierungsverfahren und Einschlusskriterien der Probanden für die Repräsentativität der Studien von Bedeutung.

Die Teilnehmer der vorliegenden Studie wurden randomisiert über das Zentralverwaltungsreferat München ausgewählt und per Post angeschrieben. Durch dieses Vorgehen konnte erzielt werden, dass das Probandenkollektiv aus einer Gruppe nicht verwandter, volljähriger Personen beider Geschlechtes, aus allen Sozial- und Bildungsschichten bestand.

Da bestimmte Erkrankungen Einfluss auf kognitive Leistung haben können, wurden in diese Studie nur neuropsychiatrisch unauffällige Personen aufgenommen. Gehirnschäden, Demenzerkrankungen, Alkohol- und Drogenmissbrauch und neurochirurgische Eingriffe können eine vorübergehende oder permanente Reduktion der kognitiven Leistungsfähigkeit bewirken (Deary 2000). Ebenso wurden Personen mit positiver Familienanamnese bezüglich neuropsychiatrischer Erkrankungen ausgeschlossen. Um diese herauszufiltern, wurden mehrere Untersuchungen, wie Telefonscreening, anamnestische Fragebögen und verschiedene Persönlichkeitstests (MMST, SKID und FHAM), durchgeführt. Desweiteren wurden alle geladenen Probanden körperlich neurologisch untersucht. Mit diesen umfangreichen Maßnahmen konnte ausgeschlossen werden, dass die Teilnehmer oder deren Verwandte in der näheren Blutsverwandschaft an neuropsychiatrischen Erkrankungen litten. Damit lässt sich eine Beeinflussung der Assoziationsergebnisse durch Erkrankungen, die Kognition oder Intelligenz betreffen könnten, weitgehend ausschließen.

Die bisher veröffentlichten Studien zu GRIN1-Polymorphismen fanden immer mit psychiatrisch kranken Personen und gesunden Vergleichsgruppen statt. Dabei wurde vor allem nach Assoziationen mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises, aber auch mit bipolaren Störungen und Alkoholabhängigkeit, gesucht. Die verwendeten Einschluss- und Diagnosekriterien sind in den jeweiligen Studienveröffentlichungen oft nicht klar erkennbar. Paus et al., Rice et al. und Zhao et al. stellten die Diagnose der Schizophrenie-Patienten mittels DSM-III-R-Kriterien (Paus et al. 2004, Rice et al. 2001, Zhao et al. 2006), während Williams et al., Martucci et al., Qin et al., Begni et al., Georgi et al. und Galehdari et al. die DSM-IV-Kriterien verwendeten (Williams et al. 2002; Martucci et al. 2003; Qin et al. 2005; Begni et al. 2003; Georgi et al. 2007; Galehdari et al. 2009). Die Patienten von Sakurai et al. wurden durch DSM-II-R-Kriterien erfasst (Sakurai et al. 2000). Die Diagnosestellung der insgesamt 288 Patienten von Mundo et al. erfolgte mittels DSM-IV. Darunter litten 199 Personen an der Diagnose Bipolar I, 77 an Bipolar II und 12 an schizoaffectiven Störungen (Mundo et al. 2003). Rujescu et al. rekrutierten ihre Patientengruppe Alkoholabhängiger aus Suchtstationen der Universitätskliniken München und Mainz (Rujescu et al. 2005).

Um Populationsstratifikation vorzubeugen, sollten Assoziationsstudien mit relativ homogenen Populationen durchgeführt werden. In der vorliegenden Studie wurde deshalb ein großer Wert auf eine einheitliche ethnische Abstammung gelegt. Die untersuchten Personen wurden aus Einwohnern Münchens und Umgebung mit ethnisch-deutscher Herkunft ausgewählt. Dabei mussten beide Eltern und Großeltern aus Deutschland stammen.

Die bisher veröffentlichten Studien zu Variationen im GRIN1-Gen fanden in verschiedenen Populationen statt. Keine Assoziationen von GRIN1-Polymorphismen mit Schizophrenie wurden in den Studien von Sakurai et al., Williams et al. und Paus et al. gefunden, die Probanden aus der Bevölkerung Japans (Sakurai et al. 2000), Großbritanniens und Irlands (Williams et al. 2002) bzw. Deutschlands mit gemischter ethnischer Abstammung (Paus et al. 2004) untersuchten. Ebenfalls keine Assoziationen fanden Martucci et al., die Probanden kanadischer Herkunft mit überwiegend kaukasischer Abstammung prüften (Martucci et al. 2003). Rice et al. untersuchten Probanden gemischter Abstammung, wobei von den 114 Probanden 86 Kaukasier, 16 Afrikaner, 7 amerikanische Ureinwohner und 5 Asiaten waren. Dabei waren sie die erste Forschergruppe, die eine groß angelegte Studie mit Teilnehmern verschiedener ethnischer Abstammung durchführten, um das gesamte GRIN1-Gen auf Basenaustauschpolymorphismen hin zu erforschen (Rice et al. 2001).

Die Referenzstudien, in denen Assoziationen zu Schizophrenie gefunden wurden, wurden in Asien und Europa durchgeführt. Zhao et al. und Qin et al. untersuchten ausschließlich Probanden der chinesischen Bevölkerung (Zhao et al. 2006, Qin et al. 2005). Galehdari et al. führten ihre Untersuchung im Iran mit Probanden gemischter Ethnizität durch (Galehdari et al. 2009). Teilnehmer der Schizophrenie-Studie von Begni et al. waren ausnahmslos Kaukasier, die in Norditalien lebten (Begni et al. 2003). Ebenso nahmen an der Studie von Georgi et al. ausschließlich Kaukasier teil, die aber aus Deutschland kamen (Georgi et al. 2007).

Hinsichtlich Assoziationen bipolarer Störungen mit GRIN1 wurde von Mundo et al. in Kanada geforscht. Von den insgesamt 288 Probanden waren 279 europäisch-kaukasischen Ursprungs, desweiteren nahmen 6 Asiaten und 3 amerikanische Ureinwohner teil. Inwiefern sich die ethnische Abstammung auf die Ergebnisse auswirkte wird in der Studie von nicht erwähnt (Mundo et al. 2003). Die

Untersuchungen zu bipolaren Störungen von Georgi et al. wurden an der deutschen Bevölkerung durchgeführt (Georgi et al. 2006).

Ebenso wurden die Analysen bezüglich Alkoholabhängigkeit und GRIN1 von Rujescu et al. in Deutschland durchgeführt, wobei alle Studienteilnehmer mitteleuropäischer Herkunft waren (Rujescu et al. 2005).

Die kognitiven Leistungen wurden in dieser Arbeit mit dem Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene (HAWIE-R) gemessen. Er zählt zu den am weitverbreitetsten Intelligenztests. Gemessen wurden Verbal-, Handlungs- und Gesamt-IQ sowie die Rohwerte der verschiedenen Untertests. Der HAWIE-R weist eine hohe Validität und Stabilität in allen Altersgruppen auf (Bouchard und McGue 1981). Er liefert eine gute Messung der allgemeinen Intelligenz ‚g‘ (Tewes 1994), unter anderem, weil er auf die Messung der präfrontalen Kognition ausgerichtet ist (Daneman und Merikle 1996). Im Handlungsteil des HAWIE-R wird sowohl fluide als auch kristalline Intelligenz und im Verbalteil vor allem die kristalline Intelligenz repräsentiert (Duncan et al. 1995; Woodcock 1990).

Insgesamt wird der HAWIE-R recht häufig in Studien verwendet, was eine gute Grundlage schafft, um Studien miteinander zu vergleichen.

Ein weiterer Vorteil des HAWIE-R ist der Aufbau des Intelligenztests in Form eines Interviews, wodurch der Untersucher einen umfassenden Gesamteindruck über den Probanden gewinnen kann und neben den schon oben erwähnten Tests zum Ausschluss von neuropsychiatrischen Krankheiten dieses Kriteriums zusätzlich durch seinen subjektiven Eindruck zu prüfen vermag.

Die geringe Auswertungsobjektivität in verschiedenen Tests des Verbalteils ist eine bekannte Schwäche des HAWIE-R. Die Untersucher waren angewiesen, die Tests streng nach Handanweisung durchzuführen. Jeder Interviewer wurde zuerst bei der gesamten Durchführung des HAWIE-R durch die Studienleitung geprüft und anschließend zur Untersuchung von Probanden freigegeben. Ein Spielraum bei den Bewertungen der Tests ist aber trotzdem nicht zu vermeiden. Daher kann die Punkteverteilung bei verschiedenen Interviewern in einem gewissen Rahmen voneinander abweichen. So wird in einigen Untertests vom Untersucher subjektiv entschieden, wie er Qualität und Inhalt der Antworten einschätzt und welche Anzahl

an Punkten er vergibt. Einer dieser Tests ist der ‚Wortschatztest‘, bei dem in dieser Studie ein Trend festgestellt wurde. Ein gewisser Ermessensspielraum ist in diesem Test auch bei genauer Befolgung der Handlungsanweisung nicht zu vermeiden, weswegen die Punktevergabe etwas variieren kann. Der Test ‚Figurenlegen‘, bei dem in dieser Studie ebenfalls ein Trend bestimmt wurde, wird hingegen durch die Punktevergabe nach Zeitdauer sehr objektiv gemessen.

Bisher liegt noch keine Referenzstudie vor, in welcher die Assoziation von Polymorphismen des GRIN1-Gens mit Kognition gesondert untersucht wurde. Auch in der genannten Referenzliteratur wurden die Probanden nicht auf ihre kognitiven Fähigkeiten mittels Intelligenz- oder Aufmerksamkeitstests geprüft.

6.3. Ausblick auf zukünftige Untersuchungen

Intelligenz ist ein überaus vielschichtiges Merkmal. Mit Ausnahme schwerer geistiger Behinderungen, die teilweise auf Veränderungen in einem einzelnen Gen zurückzuführen sind, entstehen die Ausprägungen der Intelligenz durch Polymorphismen vieler Gene oder vieler Quantitative Trait Loci (QTL), die auch die nicht translatierten bzw. nicht transkribierten Bereiche des Genoms umfassen können. Diese können zudem mit Umweltfaktoren sowie auch untereinander zusammenwirken (Rowe 1997). Aus der Abhängigkeit der Intelligenz von den kleinen Anteilen vieler Gene bzw. QTL folgt, dass der Effekt eines einzelnen Gens im Mittel sehr gering ist. Es ist möglich, dass die Beiträge einzelner Gene bzw. QTL zur Varianzaufklärung so gering sind, dass sie kaum identifiziert werden können. Die Effektstärken liegen bei maximal 1%, was bedeutet, dass ein Gen wahrscheinlich etwa 1% der Populationsvarianz der Intelligenz erklärt (Plomin et al. 2003; Plomin et al. 2006).

Verschiedenste Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und Kognition hin. Allerdings existiert bisher keine Studie zu Assoziationen von Polymorphismen des GRIN1-Gens mit kognitiven Leistungen neuropsychiatrisch gesunder Personen. Ein eindeutiger

molekulargenetischer Beweis, dass das GRIN1-Gen kognitive Phänotypen beeinflusst, existiert also bisher nicht. Zum SNP V285V (rs1126442) wurden insgesamt bisher nur sehr wenige Untersuchungen durchgeführt. Ein Vergleich zu anderen Ergebnissen fällt daher sehr schwer.

In der vorgelegten Arbeit konnte keine Assoziation zwischen dem hier untersuchten Basenaustauschpolymorphismus und Kognition festgestellt werden. Um das zu bestätigen sind weitere Studien notwendig.

Die SNP-Analyse bietet die Möglichkeit, gezielt menschliche Gene und deren Assoziationen zu untersuchen und die Signifikanz genetischer Variationen zu verstehen. Um den Einfluss des GRIN1-Gens auf Kognition weiter zu ergründen ist es erforderlich, weitere SNPs des GRIN1-Gens speziell an gesunden Probanden zu analysieren. Bisher konnten über 200 polymorphe Stellen innerhalb des GRIN1-Gens identifiziert werden, von denen einige im Kopplungsungleichgewicht stehen und nicht unabhängig voneinander beurteilt werden können (NCBI 2010). Der Einfluss eines einzelnen SNP ist oft quantitativ gering und wird erst in Wechselwirkung mit anderen SNPs deutlich (Zhao et al. 2006). In den meisten Referenzstudien wurden jedoch bisher isoliert einzelne Marker innerhalb des GRIN1-Gens analysiert.

Weiterhin wäre interessant, inwiefern Basenaustauschpolymorphismen der anderen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten für kognitive Leistungen verantwortlich sind und welche Auswirkung die Kombination der verschiedenen Untereinheiten dabei hat.

Es ist erwiesen, dass für kognitive Fähigkeiten eine Vielzahl an Genen eine Rolle spielt, die komplementär wirken und zusammen mit Umweltfaktoren die Gesamtstruktur der Kognition ergeben. Der NMDA-Rezeptor ist dabei nur einer von vielen Faktoren, die für Funktionen der Kognition essentiell sind. Die Identifizierung dieser verschiedenen Faktoren kann zum Verständnis von Funktionen des ZNS beitragen und dadurch helfen, Therapieverfahren für neuropsychiatrische Erkrankungen zu finden.

7. Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Erklärung
A	Adenin/Adenosin
ALDH5	Aldehyde Dehydrogenase 5
AL-Puffer	Aluminium-Puffer
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate
AP-5	D-2-amino-5-phosphonopentanoic
APOE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare (base pairs)
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches-Adenosinmonophosphat
CHRM2	cholinerge Muskarinrezeptor 2
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
DCS	D-cycloserine
df	Freiheitsgrade (degrees of freedom)
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders der American Psychiatric Association
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FHAM	Family History Assessment Module
G	Guanin/Guanosin
G	Generelle kognitive Fähigkeit
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
G-Protein	Guaninnukleotid Bindungsprotein
GRIN1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1
HAWIE	Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene
HSP	Hitzeschockprotein (heat-shock-protein)
IQ	Intelligenzquotient
KA	Kainat
kb	Kilobasenpaare
LTD	Langzeitdepression (long-term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (long-term potentiation)
MMST	Mini-Mental-State-Test
MW	Mittelwert
N	Probandenzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N- / C-Terminus	Amino-Ende
P	Signifikanz, p-Wert (probability)
PCR	Polymerasekettenreaktion
q (Chromosom)	langer Arm eines Chromosoms (queue)
R	Reliabilität
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
S	spezifischer Intelligenzfaktor
SD	Standardabweichung

Abkürzungen und Fachbegriffe

SKID	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV
SNP	Einzel (Single)-Nukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat Puffer
TH	Tyrosinhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol
WAIS	Wechsler Adult Intelligence Scale
WISC	Wechsler Intelligence Scale for Children

8. Literaturverzeichnis

1. Aamont SM, Constantine-Paton M. 1999. The role of neuronal activity in synaptic development and its implications for adult brain function. *Advances in Neurology* 79:133-144.
2. Alarcon M, Plomin R, Fulker DW, Corley R, DeFries JC. 1998. Multivariate path analysis of specific cognitive abilities data at 12 years in the Colorado Adoption Project. *Behav Genet* 28:255-264.
3. Amelang M, Bartussek D. 1994. *Differentielle Psychologie und Persönlichkeitsforschung*. Berlin.
4. Aylward E, Walker E, Bettis B. 1984. Intelligence in schizophrenia: meta-analysis of the research. *Schizophr Bull* 10:430-459.
5. Bear MF, Cooper LN, Ebner FF. 1987. A physiological basis for a theory of synapse modification. *Science* 237:42-48.
6. Begni S, Moraschi S, Bignotti S, Fumagalli F, Rilloso L, Perez J, Gennarelli M. 2003. Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter region and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 53:617-619.
7. Behe P, Stern P, Wyllie DJ, Nassar M, Schoepfer R, Colquhoun D. 1995. Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 262:205-213.
8. Bøddeker I, Ziegler A. 2000. Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 125:810-815.
9. Boomsma DI. 1993. Current status and future prospects in twin studies of the development of cognitive abilities, infancy to old age. In: Bouchard TJ, Propping P. *Twins as a tool of Behavioural Genetics*. Chichester: John Wiley & Sons. 82 p.

10. Borkenau P. 1993. Anlage und Umwelt. Eine Einführung in die Verhaltensgenetik. Göttingen.
11. Bouchard TJ. 1998. Genetic and environmental influences on adult intelligence and special mental abilities. Hum Biol 70:257-279.
12. Bouchard TJ, Heston L, Eckert E, Keyes M, Resnick S. 1981. The Minnesota study of twins reared apart: project description and sample results in the developmental domain. Prog Clin Biol Res 69 :227-233.
13. Bouchard TJ, McGue M. 1981. Familial studies of intelligence: A review. Science 212:1055-1059.
14. Brewer GJ, Cotman CW. 1989. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. Neuroscience Letters 99:268-273.
15. Burt C. 1966. The genetic determination of differences in intelligence: a study of monozygotic twins reared together and apart. Br J Psychol 57:137-153.
16. Butcher LM, Meaburn E, Knight J. 2005. Snps, microarrays and pooled DNA: identification of four loci associated with mild mental impairment in a sample of 6000 children. Hum Mol Genet 14:1315-1325.
17. Butcher LM, Davis OSP, Craig IW, Plomin R. 2008. Genome-wide quantitative trait locus association scan of general cognitive ability using pooled DNA and 500K single nucleotide polymorphism microarrays. Genes, Brain and Behavior, 7: 435-446.
18. Cardon LR, Fulker DW, DeFries JC, Plomin R. 1992. Multivariate genetic analysis of specific cognitive abilities in the Colorado Adoption Project at age 7. Intelligence 16:383-400.
19. Cattell RB. 1950. Personality: A systematic, theoretical, and factual study. New York: McGraw Hill.

20. Cattell RB. 1966. Handbook of multivariate experimental psychology. Chicago: Rand McNally.
21. Cattell RB. 1971. Abilities: Their structure, growth, and action. Boston: Houghton Mifflin.
22. Cattell RB. 1982. The inheritance of personality and ability: Research methods and findings. New York: Academic Press.
23. Chipuer HM, Rovine MJ, Plomin R. 1990. LISREL modeling: Genetic and environmental influences on IQ revisited. *Intelligence* 14:11-29.
24. Choi D. 1992. Excitotoxic cell death. *Science* 258:241-243.
25. Chorney MJ, Chorney K, Seese N, Owen MJ, Daniels J, McGuffin P, Thompson LA, Detterman DK, Benbow C, Lubinski D, Eley T, Plomin R. 1998. A quantitative trait locus associated with cognitive ability in children. *Psychol Sci* 9:159-166.
26. Cirillo MA, Seidman LJ. 2003. Verbal declarative memory dysfunction in schizophrenia: from clinical assessment to genetics and brain mechanisms. *Neuropsychol Rev*.13(2):43-77.
27. Clements JD, Westbrook GL. 1991. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7:605-613.
28. Comings DE, Wu S, Rostamkhani M. 2003. Role of the cholinergic muscarinic 2 receptor (CHRM2) gene in cognition. *Mol Psychiatry* 8:10-13.
29. Conrad W. 1983. Intelligenzdiagnostik. In Michel, L. (Hrsg.), *Intelligenz und Leistungsdiagnostik*. Göttingen, Toronto, Zürich: Hofgrete Verlag für Psychologie.

30. Constantine-Paton M, Cline HT. 1998. LTP and activity-dependent synaptogenesis: the more alike they are, the more different they become. *Curr Opin Neurobiol* 8:139-148.
31. Constantine-Paton M, Cline HT, Debski E. 1990. Patterned activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu Rev Neurosci* 13:129-154.
32. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
33. Daneman M, Merikle PM. 1996. Working memory and language comprehension: A metaanalysis. *Psychonomic Bulletin & Review* 3: 422-433.
34. Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W. 1998. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393:377-381.
35. Deary IJ. 2001. Human intelligence differences: a recent history. *Trends Cogn Sci* 5:127-130.
36. Deary IJ, Hamilton G, Hayward C. 2005a. Nicastrin gene polymorphisms, cognitive ability level and cognitive ageing. *Neurosci Lett* 373:110-114.
37. Deary IJ, Harris SE, Fox HC. 2005b. KLOTHO genotype and cognitive ability in childhood and old age in the same individuals. *Neurosci Lett* 378:22-27.
38. Deary IJ, Whiteman MC, Pattie. 2002. Cognitive change and the APOE e4 allele. *Nature* 418:932.
39. Deary IJ, Whiteman MC, Starr JM, Whalley LJ, Fox HC. 2004a. The impact of childhood intelligence on later life: following up the Scottish Mental Surveys of 1932 and 1947. *J Pers Soc Psychol* 86:130-147.

40. Deary IJ, Wright AF, Harris SE, Whalley LJ, Starr JM. 2004b. Searching for genetic influences on normal cognitive ageing. *Trends Cogn Sci* 8:178-184.
41. Devlin B, Daniels M, Roeder K. 1997. The heriability of IQ. *Nature* 388:468-471.
42. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The Glutamate Receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* 51:7-61.
43. Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB. 1999. Biochemical Studies of the Structure and Function of NMDA subtype of glutamate receptors. *Molecular Neurobiology* 19:151-179.
44. Duncan J, Burgess P, Emslie H. 1995. Fluid intelligence after frontal lobe lesions. *Neuropsychologica* 33:261-268.
45. Eberhard-Metzger C. 1998. Stichwort Zwillinge. München: Wilhelm Heyne. 82 p.
46. Estes WK. 1982. Learning, memory and intelligence. In: Sternberg RJ. *Handbook of human intelligence*. Cambridge: Cambridge University Press.
47. Eysenck HJ. 1975. *Die Ungleichheit der Menschen*. München.
48. First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. 1997. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I and II Disorders*. Washington, DC: American Psychiatric Press.
49. Fisher PJ, Turic D, Williams NM, McGuffin P, Asherson P, Ball D, Craig I, Eley T, Hill L, Chorney K, Chorney MJ, Benbow CP, Lubinski D, Plomin R, Owen MJ. 1999. DNA pooling identifies QTLs on chromosome 4 for general cognitive ability in children. *Hum Mol Genet* 8:915-922.

50. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189-198.
51. Folstein MF, Robins LN, Helzer JE. 1983. The Mini-Mental State Examination. *Archives of General Psychiatry* 40:812.
52. Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL. 1994. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13:325-338.
53. Fulker DW, DeFries JC, Plomin R. 1988. Genetic influence on general mental ability increases between infancy and middle childhood. *Nature* 336:767-769.
54. Gage NL, Berliner DC. 1996. *Pädagogische Psychologie*. Weinheim: Psychologische Verlagsunion.
55. Galehdari H, Pooryasin A, Foroughmand A, Daneshmand S, Saadat M. 2009. Association between the G1001C polymorphism in the GRIN1 gene promoter and schizophrenia in the Iranian population. *J Mol Neurosci*. 38(2):178-81.
56. Georgi A, Jamra RA, Klein K, Vilella AW, Schumacher J. 2007. Possible association between genetic variants at the GRIN1 gene and schizophrenia with lifetime history of depressive symptoms in a German sample. *Psychiatr Genet*. 17(5):308-10.
57. Georgi A, Jamra RA, Schumacher J, Becker T, Schmael C. 2006. No association between genetic variants at the GRIN1 gene and bipolar disorder in a German sample. *Psychiatr Genet*. 2006 Oct;16(5):183-4.
58. Goldstein DB, Ahmadi KR, Weale ME, Wood NW. 2003. Genome scans and candidate gene approaches in the study of common diseases and variable drug responses. *Trends Genet* 19:615-622.

59. Gould E, Cameron HA. 1997. Early NMDA receptor blockade impairs defensive behavior and increases cell proliferation in the dentate gyrus of developing rats. *Behav Neurosci* 111:49-56.
60. Groffmann KJ. 1964. Die Entwicklung der Intelligenzmessung. In: Heiss, R: *Handbuch der Psychologie*. Band 6: Psychologische Diagnostik. Göttingen.
61. Guthke J. 1980. Ist Intelligenz meßbar? Einführung in Probleme der psychologischen Intelligenzforschung und Intelligenzdiagnostik. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften.
62. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346:866-868.
63. Holling H, Preckel F, Vock M. 2004. Intelligenzdiagnostik. Göttingen: Hogrefe.
64. Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S. 1993. Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10:943-954.
65. Hollmann M, Heinemann S. 1994. Cloned glutamat receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
66. Huguelet P, Nicastro R, Zanello A. 2002. Influence of attention on an auditory-verbal learning test in schizophrenic patients. *Encephale*. 28(4):291-7.
67. Huntsman MM, Tran BV, Potkin SG, Bunney WE, Jones EG. 1998. Altered ratios of alternatively spliced long and short gamma2 subunit mRNAs of the gamma-amino butyrate type a receptor in prefrontal cortex of schizophrenics. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15066-15071.
68. Inlow JK, Restifo LL. 2004. Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* 166:835-881.

69. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S. 1993. Molecular characterization of the family of the NMDA receptor subunits. *J Biol Chem* 268:2836-2843.
70. Kandel ER, O'Dell TJ. 1992. Are adult learning mechanisms also used for development? *Science* 258:243-245.
71. Karp SJ, Masu M, Eki T, Ozawa K, Nakanishi S. 1993. Molecular cloning and chromosomal localization of the key subunit of the human N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 268:3728-3733.
72. Kelley TL, Ruch GM, Terman LM. 1922. The Stanford Achievement Test. Youngers-on-Hudson, NY: World Book.
73. Komuro H, Rakic P. 1998. Orchestration of neuronal migration by activity of ion channels, neurotransmitter receptors, and intracellular Ca²⁺ fluctuations. *J Neurobiol* 110-130.
74. Lachman HM, Papolos DF, Saito T. 1996. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6:243-250.
75. Laube B, Kuhse J, Betz H. 1998. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci* 18:2954-2961.
76. Laurie DJ, Putzke J, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Tölle TR. 1995. The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Mol Brain Res* 32:94-108.
77. Luciano M, Wright MJ, Duffy MA. 2006. Genome-wide scan of IQ finds significant linkage to a quantitative trait locus on 2q. *Behav Genet* (in press).

78. Luo D, Petrill SA, Thompson LA. 1994. An exploration of genetic g: hierarchical factor analysis of cognitive data from the Western Reserve Twin Project. *Intelligence* 18:335-347.
79. Madden DR. 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91-101.
80. Manove E, Levy B. 2010. Cognitive impairment in bipolar disorder: an overview. *Postgrad Med*. 122(4):7-16.
81. Martucci L, Wong AHC, Tracalo J, Cate-Carter T, Wong GWH, Macciardi FM, and Kennedy JL. 2003. N-Methyl-D-Aspartate Receptor NR1 Subunit Gene (GRIN1) in Schizophrenia: TDT and Case-Control Analysis. *American Journal of Medical Genetics Part B* 119B:24-27.
82. Matarazzo JD. 1982. Die Messung und Bewertung der Intelligenz Erwachsener nach Wechsler. Bern: Huber.
83. Matsuoka N, Aigner TG. 1996. D-cycloserine, a partial agonist at the glycine site coupled to N-methyl-D-aspartate receptors, improves visual recognition memory in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 278:891-897.
84. McClearn GE, Johansson B, Berg S, Pedersen NL, Ahern F, Petrill SA, Plomin R. 1997. Substantial genetic influence on cognitive abilities in twins 80 or more years old. *Science* 276:1560-1563.
85. McDonald JF, Xiong XG, Lu WY, Raouf R, Orser BA. 1998. Modulation of NMDA receptors. *Prog Brain Res* 16:191-208.
86. McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, Wilson MA. 1996. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 87:1339-1349.
87. McNaughton BL, Barnes CA. 1990. From cooperative synaptic enhancement to associative memory: bridging the abyss. *Neuroscience* 2:403-416.

88. Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M. 1992. Functional characterization of heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* 357:70-74.
89. Mohamed S, Paulsen JS, O'Leary D, Arndt S, Andreasen N. 1999. Generalized cognitive deficits in schizophrenia: a study of first-episode patients. *Archives of Generalized Psychiatry* 56:749-54.
90. Monahan JB et al. 1989. D-cycloserine, a positive modulator of the N-methyl-D-aspartate receptor, enhances performance of learning tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 34:649-653.
91. Monyer H, Burnashew N, Laurie DJ, Sakman B, Seeburg PH. 1994. Developement and regional expression in the rat brain and functional propertie of four NMDA Receptors. *Neuron* 12:529-540.
92. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Sakman B, Seeburg P. 1992. Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes NR2A, B, C, D. *Science* 256:1566-1570.
93. Morris RG et al. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
94. Moskovina V, Craddock N, Homans P, Nikolov I, Phawa JS, Green E, Wellcome Trust Case. Control Consortium, Owen MJ, O'Donovan MC. 2009. Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common isk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol Psychiatry* 14: 252-260.
95. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci.Am.* 262[4], 55-56. 1990.

96. Mundo E, Tharmalingham S, Neves-Pereira M, Dalton EJ, Macciardi F, Parikh SV, Bolonna A. 2003. Evidence that the N-methyl-D-aspartate subunit 1 receptor gene (GRIN1) confers susceptibility to bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 8:241-245.
97. Naeve GS, Ramakrishnan M, Kramer R, Hevroni D, Citri Y, Theill LE. 1997. Neuritin. A gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2648-2653.
98. Newman HH, Freeman FN, Holzinger KJ. 1937. *Twins: A Study of Heredity and Environment*. Chicago: University of Chicago Press.
99. Nicholls DG. 1993. The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem* 212:613-631.
100. Paus S, Rietschel M, Schulze TG, Ohlraun S, Diaconu CC, Van Den Bogaert A, Maier W. 2004. Systematic screening for mutations in the human N-methyl-D-aspartate receptor 1 gene in schizophrenic patients from the German population. *Psychiatr Genet* 14:233-234.
101. Payton A, Holland F, Diggle P. 2003. Cathepsin D exon 2 polymorphism associated with general intelligence in a healthy older population. *Mol Psychiatry* 8:1-5.
102. Perry W, Light GA, Davis H, Braff DL. 2000. Schizophrenia patients demonstrate a dissociation on declarative and non-declarative memory tests. *Schizophr Res.* 46(2-3):167-74.
103. Petrill SA, Plomin R, McClearn GE, Smith DL, Vignetti S, Chorney MJ, Chorney K, Thompson LA, Detterman DK, Benbow C. 1996. DNA markers associated with general and specific cognitive abilities. *Intelligence* 23:191-203.

104. Pin J-P, Duvoisin R. 1995. Review: neurotransmitter receptors I. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
105. Pitkanen M et al. 1995. The effects of D-cycloserine and MK-801 on the performance of rats in two spatial learning and memory tasks. *Eur Neuropsychopharmacol* 5:457-463.
106. Plomin R, DeFries JC, McClearn GE, Rutter M. 1999. Gene, Umwelt und Verhalten - Einführung in die Verhaltensgenetik. Huber Verlag.
107. Plomin R, Hill L, Craig IW, McGuffin P, Purcell S, Sham P, Lubinski D, Thompson LA, Fisher PJ, Turic D, Owen MJ. 2001. A genome-wide scan of 1842 DNA markers for allelic associations with general cognitive ability: a five-stage design using DNA pooling and extreme selected groups. *Behav Genet* 31:497-509.
108. Plomin R, Petrill S. 1997. Genetics and intelligence: what's new? *Intelligence* 24:53-77.
109. Plomin R, Turic DM, Hill L. 2004. A functional polymorphism in the succinate-semialdehyde dehydrogenase (aldehyde dehydrogenase 5 family, member a1) gene is associated with cognitive ability. *Mol Psychiatry* 9:582-586.
110. Posthuma D, Baare WF, Hulshoff Pol HE, Kahn RS, Boomsma DI, de Geus EJC. 2003. Genetic correlations between brain volumes and the WAIS-III dimensions of verbal comprehension, working memory, perceptual organization, and processing speed. *Twin Res* 6:131-139.
111. Posthuma D, de Geus EJC, Boomsma DI. 2001. Perceptual speed and IQ are associated through common genetic factors. *Behav Genet* 31:593-602.
112. Posthuma D, Luciano M, de Geus EJC. 2005. A genomewide scan for intelligence identifies quantitative trait loci on 2q and 6p. *Am J Hum Genet* 77:318-326.

113. Premkumar LS, Auerbach A. 1997. Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol* 110:485.
114. Pschyrembel. 2002. *Klinisches Wörterbuch*. Berlin, New York: de Gruyter.
115. Qin S, Zhao X, Pan Y, Liu J, Feng G, Fu J, Bao J, Zhang Z, He L. 2005. An association study of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) and NR2B subunit gene (GRIN2B) in schizophrenia with universal DNA microarray. *Eur J Hum Genet* 13:807-814.
116. Ramakers GJ. 2002. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 25:191-199.
117. Randolph C, Gold JM, Carpenter CJ, Goldberg TE, Weinberger DR. 1993. Implicit memory in patients with schizophrenia and normal controls: effects of task demands on susceptibility to priming. *Journal of Clinical Experimental Neuropsychology* 15:853-66.
118. Rappaport SR. 1953. Intellectual deficit in organics and schizophrenics. *J Consult Psychol* 17:389-395.
119. Rice JP, Reich T, Bucholz KK, Neuman RJ, Fishman R, Rochberg N, Hesselbrock VM, Nurnberger JI, Schuckit MA, Begleiter H. 1995. Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 19:1018-1023.
120. Rice SR, Niu N, Berman DB, Heston LL, Sobell JL. 2001. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other sequence changes and estimation of nucleotide diversity in coding and flanking regions of the NMDAR1 receptor gene in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 6:274-284.
121. Rice T, Fulker DW, DeFries JC. 1986. Multivariate path analysis of specific cognitive abilities in the Colorado Adoption Project. *Behav Genet* 16:107-125.

122. Rijdsdijk FV, Vernon PA, Boomsma DI. 2002. Application of hierarchical genetic models to raven and WAIS subtests: a Dutch Twin Study. *Behav Genet* 32:199-210.
123. Roberts M, Shapiro M. 2002. NMDA receptor antagonists impair memory for nonspatial, socially transmitted food preference. *Behav Neurosci* 116:1059-1069.
124. Rowe DC. 1997. *Genetik und Sozialisation*. Beltz Weinheim.
125. Rowland LM, Astur RS, Jung RE, Bustillo JR, Lauriello J, Yeo RA. 2005. Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology* 30:633-639.
126. Rujescu D, Soyka M, Dahmen N, Preuss U, Hartmann AM, Giegling I, Koller G, Bondy B, Moller HJ, Szegedi A. 2005. GRIN1 locus may modify the susceptibility to seizures during alcohol withdrawal. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133:85-87.
127. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
128. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, and Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230[4732], 1350-1354. 1985.
129. Sakurai K, Toru M, Yamakawa-Kobayashi K . 2000. Mutation analysis of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (GRIN1) in schizophrenia. *Neurosci Lett* 296:168-170.
130. Sambrook J. 1989. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2.

131. Saß H, Wittchen H-U, Zaudig M. 1998. Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-IV. Göttingen: Hogrefe.
132. Seeburg PH. 1993. The TiPS/TINS lecture: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 14:297-303.
133. Shapiro ML, Eichenbaum H. 1999. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus* 9:365-384.
134. Shields J. 1962. Monozygotic twins: Brought up apart and brought up together. London: Oxford University Press.
135. Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ. 2000. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290:1170-1174.
136. Skelley SL, Goldberg TE, Egan MF, Weinberger DR, Gold JM. 2008. Verbal and visual memory: characterizing the clinical and intermediate phenotype in schizophrenia. *Schizophr Res*. 105(1-3):78-85.
137. Small B, Rosnick CB, Fratiglioni L, Backman L. 2004. Apolipoprotein E and cognitive performance: a meta-analysis. *Psychol Aging* 19:592-600.
138. Smith JD. 2002. Apolipoproteins and aging: emerging mechanisms. *Ageing Res Rev* 1:345-365.
139. Spearman C. 1904. General intelligence objectively determined and measured. *American Journal of Psychology* 15:201-292.
140. Stefani MR et al. 2003. Glutamate receptors in the rat medial prefrontal cortex regulate set-shifting ability. *Behav Neurosci* 117:728-737.

141. Stern W. 1912. Die psychologischen Methoden der Intelligenzprüfung und deren Anwendung an Schulkindern. 5. Kongress der experimentellen Psychologie. Berlin.
142. Stern W. 1950. Allgemeine Psychologie auf personalistischer Grundlage. Den Haag.
143. Strachan T, Read AP. 1996. Molekulare Humangenetik. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad. Verlag.
144. Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S. 1992. Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185:826-832.
145. Sugiura N, Patel RG, Corriveau RA. 2001. N-methyl-D-aspartate receptors regulate a group of transiently expressed genes in the developing brain. *J Biol Chem* 276:14257-14263.
146. Terman LM. 1916. The Measurement of Intelligence. Boston: Houghton Mifflin.
147. Tewes U. 1991. HAWIE-R Hamburg-Wechsler Intelligenztest für Erwachsene. Revision 1991. Goettingen: Hogrefe.
148. Thurstone LL. 1931. Multiple Factor Analysis. *Psychological Review* 38:406-427.
149. Thurstone LL. 1938. Primary and Mental Abilities. Chicago.
150. Thurstone LL. 1945. Theories of Intelligence. Chicago.
151. Tingley WG, Ehlers D, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Huganir RL. 1997. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor NR1 subunit using. *J Biol Chem* 272:5157-5166.

152. Trujillo KA. 1995. Excitatory amino acids and drugs of abuse: A role for NMDA receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 38:139-154.
153. Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. 1996. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.
154. Volkenandt M, Lohr M, Dicker AP. 1990. Gene amplification by the polymerase chain reaction. *Dtsch Med Wochenschr* 115:670-676.
155. von Rosenstiel L. 1992. *Grundlagen der Organisationspsychologie*. Stuttgart.
156. Watkins JC. 2000. I-Glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans* 28:297-309.
157. Wechsler D. 1939. *Wechsler-Bellevue Intelligence Scale: Ages 7-69*.
158. Wechsler D. 1964. *Die Messung der Intelligenz Erwachsener. Textband zum Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene (HAWIE)*. Bern: Huber.
159. Wenzl A. 1957. *Theorie der Begabung. Entwurf einer Intelligenzkunde*. Heidelberg.
160. Williams JBW, Gibbon M, First MB, Spitzer RL, Davis M, Borus J, Howes MJ, Kane J, Pope HG, Rounsaville B, Wittchen H-U. 1992. The Structured Clinical Interview for DSM-III-R (SCID) II. Multi-site test-retest reliability. *Archives of General Psychiatry* 49:630-636.
161. Williams NM, Bowen T, Spurdock G, Norton N, Williams HJ, Hoogendoorn B, O'Donovan MC. 2002. Determination of the genomic structure and mutation screening in schizophrenic individuals for five subunits of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Molecular Psychiatry* 7:508-514.

162. Williams RH, Zimmerman DW, Zumbo BD, Ross D. 2003. Charles Spearman: British Behavioral Scientist. *Human Nature Review* 3:114-118.
163. Winterer G, Goldman D. 2003. Genetics of human prefrontal function. *Brain Res Rev* 43:134-163.
164. Wittchen HU, Zaudig M, Fydrich T. 1997. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV, Achse I und II. Göttingen: Hogrefe.
165. Woodcock RW. 1990. Theoretical foundations of the WJ-R measures of cognitive ability. *JPsychoeducAssess* 8:231-258.
166. Yamakura T, Shimoh K. 1999. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol* 59:279-298.
167. Zhao X, Li H, Shi Y, Tang R, Chen W, Liu J, Feng G, Shi J, Yan L. 2006. Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene GRIN1 and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:747-753.
168. Zhong J, Carrozza DP, Williams K, Pritchett DB, Molinoff PB. 1995. Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J Neurochem* 64:531-539.
169. Zigmond MJ. 1999. In: Hollmann M, Heinemann S: *Annu Rev Neurosci* 1994,17:31-108 Cloned glutamate receptors. Academic Press: Fundamental Neuroscience 251.
170. Zimbardo PG, Gerrig RJ. 2004. *Psychologie*. München: Pearson Studium.
171. Zimbardo PG, Gerrig RJ. 1999. *Psychologie*. Berlin: Springer.
172. Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J. 1995. Cloning and structure of the gene encoding the human N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* 159:219-223.

173. Zukin SR, Bennett MV. 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. Trends in Neuroscience 18:306-313.
174. Zusne L. 1957. Names in the History of Psychology. New York: John Wiley & Sons.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Möller danke ich für das Entgegenkommen, dass ich diese Arbeit in der von ihm geleiteten Psychiatrischen Universitätsklinik absolvieren durfte.

Herrn Prof. Dr. med. Dan Rujescu möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Forschungsgruppe und für die hilfsbereite und kompetente Betreuung meinen Dank aussprechen. Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Dr. biol. hum. Ina Giegling für die umfangreiche Betreuung, die Einweisung und Supervision bei der Durchführung der klinischen Tests sowie die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. biol. hum. Annette Hartmann für die kompetente Unterstützung bei labortechnischen und genetischen Angelegenheiten und für die vielen Hilfestellungen, Korrekturen, konstruktiven Gespräche und Anregungen bei der schriftlichen Erstellung dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an das Doktorandenteam, deren Zusammenarbeit unverzichtbar und überaus wertvoll war. Besonders hervorheben möchte ich Eva Danninger, Lukas Baumann und Fabian Kronschnabl, die mit ihrer guten Laune und tatkräftigen Unterstützung für Spaß an der Arbeit sorgten.

Mein Dank richtet sich auch an alle Probanden, die sich für diese Studie als Teilnehmer zur Verfügung gestellt haben.

Der herzlichste Dank gilt meinem Bruder für die Hilfe bei mathematischen Fragestellungen sowie Moritz und meinen Eltern, die mich durch ihre immerwährende Förderung und beständigen Ermutigungen über das Studium hinaus bis zur Fertigstellung dieser Arbeit verlässlich begleitet haben.